Christian Stumpf

Untersuchungen zum quantitativen Opiatnachweis im Blut mittels Enzymimmunoassay

Diss. München
1983

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Direktor: Prof. Dr.med. W. Spann

Untersuchungen zum quantitativen Opiatnachweis im Blut mittels Enzymimmunoassay

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Stumpf
aus
Landshut

Jahr
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Spann
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung
2.	Methoden der Literatur zur quantitativen Morphinbestimmung in biologischem Material
2.1.	UV-Spektrophotometrie
2.2.	Spektrofluorometrie
2.3.	Gaschromatographie
2.3.1.	Derivatisierung
2.3.2.	Verschiedene Detektoren
2.3.3.	Verwendung der Gaschromatographie in Kombination mit anderen Methoden
2.4.	Immunoassays
2.4.1.	FRAT (Free radical assay technique)
2.4.2.	Hämagglutinations-Hemmung
2.4.3.	RIA (Radioimmunoassay)
2.4.4.	EMIT (Enzyme multiplied immunoassay technique)
2.4.4.1.	Anwendung von EMIT bei Urinuntersuchungen
2.4.4.2.	Anwendung von EMIT bei Blutuntersuchungen
2.4.4.3.	Kombination von EMIT mit DC
3.	Stoffwechsel der Opiate
3.1.	Metabolismus
3.2.	Pharmakokinetik
3.3.	Therapeutische Dosierung und Letaldosis
4.	Ergebnis der Literaturübersicht
5.	Eigene Untersuchungen
5.1.	Extraktionen
5.1.1.	Amberlite xAD-2
5.1.2.	Extrelut
5.2.	EMIT-Untersuchungen
5.2.1.	Effektivität der Extraktion
5.2.2.	Extraktionen zur Erstellung von Eichkurven
5.2.2.1.	Untersuchung möglicher Fehlerquellen
5.2.2.2.	Hohe Leerextinktionen

5.2.2.3. Steigung
5.2.2.4. Präzision von Tag zu Tag
5.2.3. Untersuchung des Einflußes des Bakterienalters und des Antikörperalters auf die Extinktionsänderungen
5.2.4. Auswertungsverfahren
5.2.5.1. Festlegung des Eichbereiches und Bestimmung der kleinstmöglichen Zahl an nötigen Eichpunkten
5.2.5.2. Richtigkeitskontrollen
5.2.6. Bestimmung der Nachweisgrenze
5.2.7. Untersuchungen von Blutproben Drogentoter
5.2.7.1. Einfluß des Alters von Proben auf die Nachweisbarkeit des Morphins
5.3. Arbeitsvorschriften
5.3.1. Extraktion
5.3.1.1. Eindampfmethode
5.3.1.2. Ausschütteln
5.3.2. EMIT-Analyse
5.3.2.1. Herstellung der EMIT-Reagenzien
5.3.2.2. Analysendurchführung
6. Diskussion
7. Zusammenfassung
8. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Die Verwendbarkeit von Opiaten als Rauschmittel ist seit langem bekannt und war, besonders im asiatischen Raum, auch immer recht gebräuchlich. Vor allem in Europa wurden die damit verbundenen Suchtgefahren weitgehend unterschätzt und Opiate auch freizügig zur Schmerzbekämpfung verordnet.
Allerdings stieg ihre Verbreitung als Suchtmittel erst in den letzten 20 Jahren sprunghaft an. Zudem wurde das Opium und Morphin immer mehr vom neueren Heroin verdrängt. Heroin wurde erst Anfang dieses Jahrhunderts, zunächst als nicht süchtigmachender Ersatz für Morphin, in die Therapie eingeführt. Sehr bald stellte sich jedoch heraus, daß sein Suchtpotential noch weit höher ist und heute ist es nicht unerheblich dafür verantwortlich, daß die mit Anwendung, Sucht und Abhängigkeit verbundenen Probleme zu einem wichtigen Gebiet wissenschaftlicher Untersuchungen werden mußten.
Bei der immer stärkeren Verbreitung wird auch klar, welche Bedeutung heute in der forensischen Medizin einem sicheren und schnellen Verfahren zukommt, das dem Nachweis des Drogenmißbrauchs oder der Todesursache bei Überdosierung dient, bzw. zur Differenzierung geeignet ist, ob eine eingenommene Menge Rauschgift für den Tod verantwortlich ist. Aber auch für die Klinik kann ein solches Verfahren von entscheidender Bedeutung sein, wenn es bei unklaren Intoxikationen mit bewußtlosen Patienten darauf ankommt, möglichst schnell eine Diagnose zu sichern oder auszuschließen.
So wird die Notwendigkeit eines Screening-Verfahrens deutlich und als solches eignet sich der homogene Enzymimmunoassay, nicht zuletzt auf Grund der Möglichkeit zur automatisierten Durchführung, hervorragend.

Bis jetzt wurde er schon verschiedentlich zu Urinuntersuchungen benützt und es sind fertige Urin-Screening Tests auf dem Markt. Hier in dieser Arbeit sollte versucht werden, einen bestehenden Urintest so umzubauen, daß er sich für Blutuntersuchungen eignet und zudem quantitative Aussagen über die gefundene Morphinmenge zuläßt. Anhand von Konzentrationen kann man zum Beispiel Rückschlüsse auf das Ausmaß einer Vergiftung ziehen.
Außerdem kann es nötig sein, ähnlich der Alkoholuntersuchung, genaue Blutkonzentrationen zu ermitteln, um Aussagen über die Fahrtüchtigkeit - es sind ja schon mehrfach Autounfälle unter Drogeneinfluß bekannt geworden - oder die Zurechnungsfähigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt machen zu können.
Während der Urin also nur den Beweis der Morphinaufnahme, möglicherweise längere Zeit vorher, bieten kann, erbringt die Blutuntersuchung den Beweis der Wirkung.
Eine besondere Bedeutung kommt der Blutuntersuchung noch beim "Sekundentod" (siehe 3.3.) zu, da in diesem Falle zwar niedrige Blutkonzentrationen gefunden werden, der Nachweis im Urin hingegen nicht möglich ist.

2. Methoden der Literatur zur quantitativen Morphinbestimmung in biologischem Material

Es sind in der Literatur verschiedenste Methoden zur Bestimmung von Morphinkonzentrationen beschrieben. In dieser Übersicht soll nur auf solche eingegangen werden, die sich auch für quantitative Bestimmungen in Blut und Serum eignen.

2.1. UV-Spektrophotometrie

Die UV-Spektren von morphinähnlichen Verbindungen wurden schon von Oestreicher e.a. (100) untersucht und die charakteristischen Maxima und Minima zusammengestellt. Später versuchten Bradford und Brackett (20) die verschiedenen Morphinderivate durch spektrophotometrische Messungen zu differenzieren. Dabei zeigte sich, daß nur geringe Möglichkeiten zur Unterscheidung gegeben waren. Zudem war die Empfindlichkeit relativ gering, und schon relativ geringfügige Verunreinigungen mit Begleitstoffen störten die Identifizierung der einzelnen Substanzen erheblich. Deshalb schaltete Vidic (132) als Trennverfahren eine papierchromatographische Reinigung nach Belles und Sievert (8) voraus. Dabei wurden die aus dem Fließpapier ausgeschnittenen Opiatflecken mit gesättigter Natriumboratlösung behandelt und diese Lösung mit Chloroform/ Isobutylalkohol ausgeschüttelt. Da hier nur Extraktionsausbeuten von 55% möglich waren, ging er dann zur Kapillar-Elution nach Meloun über, womit gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Außerdem behandelte er die Morphinderivate mit 72% -iger Schwefelsäure (einstündiges Erhitzen der Proben auf 85 zusammen mit der Schwefelsäure) und erreicht dadurch charakteristische spektrale Veränderungen, die eine Unterscheidung der einzelnen Derivate ermöglichte. So erreichte er einen eindeutigen qualitati-

ven Nachweis bis 1 γ/ml. Auch konnte er Eichkurven zur quantitativen Bestimmung aufstellen.

2.2. Spektrofluorometrie

Um Morphin nachzuweisen, benutzt dieses Verfahren die Fluoreszenzeigenschaften von Pseudomorphin, das durch Oxydation von Morphin mit Kaliumferricyanid entsteht (76). Ausführliche Untersuchungen des Fluoreszenzverhaltens mit Berücksichtigung der Struktur - Aktivitätsbeziehung stellten Darwin und Cone (37) an und attestierten der Methode eine hohe Spezifität. Burkhalta e.a. (76) fanden, daß die Fluoreszenz - Konzentrationsbeziehung über weite Strecken linear verlief. Die Nachweisgrenze lag beim Nachweis in Gewebe bei 0,1 µg/g. Nach vorheriger Extraktion aus mindestens 3 ml Plasma sank sie auf 3 ng/ml. Verschiedentlich wird aber darauf hingewiesen, daß die Spektrofluorometrie nur freies und kein konjugiertes Morphin erfassen kann (26,127). Will man also das Gesamtmorphin bestimmen, so muß eine Prozedur zur Hydrolyse vorausgehen. Dafür waren bei Spiehler e.a. (127) 15 ml Blut oder 15 g Gewebe notwendig. Ohne diesen Hydrolyseschritt reichten 5 ml Blut aus. Spektrofluorometrie wurde also zur qualitativen wie quantitativen Bestimmung von Morphin herangezogen, oft auch als Zweitverfahren zusätzlich zu gaschromatografischen oder immunologischen Methoden (52,63,73,107,121). Dabei ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung mit EMIT (12), bei Vergleich mit RIA liegen die fluorometrischen Werte immer etwa um 50-100% höher als die RIA-Werte.
Bei Reed (107) waren die gaschromatografischen Werte immer doppelt so hoch wie bei der Spektrofluorometrie, wobei Reed die ersteren als zuverlässiger erachtet.

2.3. Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie ist ein sehr wichtiges und weit verbreitetes Verfahren. Es wird in den verschiedensten Modifikationen angewandt.

2.3.1. Derivatisierung

Zur Verbesserung des Nachweises und der sicheren Identifizierung wurden verschiedene Arten der Derivatisierung des Morphins (Acetylierung (24,67), Silylierung (40,96, 102) angewandt. Brochmann-Hanssen und Svendsen (21) konnten mit Trimethyl- oder Trifluoroacetylderivaten 2-10 ng/ml Morphin nachweisen.

2.3.2. Verschiedene Detektoren

Die Gaschromatographie wird mit drei verschiedenen Detektoren eingesetzt:
Der unempfindlichste ist der Flammenionisationsdetektor (29). Damit konnten 15-100 ng Morphin pro ml einer biologischen Flüssigkeit nachgewiesen werden (90). Wallace, Biggs und Blum (134) erreichten mit anderer Instrumentierung Werte bis 1 ng/ml.
Nach Smith und Cole (122) ließ sich die Nachweisgrenze mit einem Stickstoffdetektor weiter herabsetzen.
Am wirkungsvollsten ist jedoch ein Elektroneneinfangdetektor (88). Die Nachweisgrenze liegt hier nach Kogan und Chedeckel (75) im Picogrammbereich, Blake (11) gibt für seine Methode 40-200 pg an, Dahlström e.a. (36) 750 pg, bzw. 500 pg/ml (35).

2.3.3. Verwendung der Gaschromatographie in Kombination mit anderen Methoden

Da die gaschromatographischen Untersuchungen zwar quantitativ sehr genau sind, aber allein zur sicheren Identifizierung von Morphin für forensische Zwecke im allgemeinen nicht ausreichen, werden sie oft mit anderen Methoden zusammen, wie der Spektrofluorometrie, der Dünnschichtchromatographie und Infrarotspektrophotometrie angewendet. Das beste Verfahren zur eindeutigen Identifizierung ist jedoch die Kombination der GC mit der Massenspektrometrie (90,106). Auch quantitativ ist es sehr genau und weist Konzentrationen von 10 ng/ml ohne Schwierigkeiten nach (107). Bohn, Schulte, Audick (18) geben für ihre Untersuchungen einen mittleren Analysenfehler von ± 3% an. Aber auch bei der Kombination Gaschromatographie/Massenspektrometrie werden noch verschiedene Methoden angewandt:
Nakamura e.a. (30,94) benützen die Elektronenstoßionisation, Saferstein und Chao (28,114,115) chemische Ionisation, und Ebbighausen e.a. (61,41) verwenden zum Nachweis die Massenfragmentographie.
Allen Unterarten der Gaschromatographie ist gemeinsam, daß sie mit sehr geringen Probenmengen auskommen, z.B. 0,5-2 ml (135) oder sogar nur 0,1-0,2 g Blut (45). Will man allerdings das Gesamtmorphin bestimmen, so ist, wie bei allen Verfahren mit einem Extraktionsschritt, eine vorhergehende Hydrolyse notwendig.

2.4. Immunoassays

2.4.1. FRAT (Free-radical assay technique)

Leute, Ullman, Goldstein (79) entwickelten diese Technik, die ähnlich wie andere Immunoassays (EMIT,RIA) aufgebaut ist. Hierbei wird zur Markierung ein freies Radikal (Nitroxid) benutzt, dessen ungepaartes Elektron ein magnetisches Moment produziert und mit einem Elektronen-Spin Resonanzspektrometer nachgewiesen werden kann. FRAT ist ein sog. homogener Immunoassay, d.h. er benötigt keinen Trennschritt zwischem gebundenem und freiem Antigen, so wie er für RIA notwendig ist.
FRAT wird in der Literatur (58,78,26) ohne vorhergehende Extraktion zur Analyse von Speichel und Urin benützt. Leute e.a. (78) brauchen 20 µl Urin und können Morphinkonzentrationen $< 0{,}1$ µg/ml nachweisen. Gorodetzky und Kullberg (58) untersuchen 50 ul einer Probe flüssigen Speichels. Ab einer Dosis von 5 mg/70 kg i.v. gelingt ein 100%-iger Nachweis innerhalb von einer Stunde nach Applizierung des Heroins. Als Nachweisgrenze werden ca. 22 ng/ml angegeben. Falsch positive Ergebnisse gab es in 8% der Fälle.

2.4.2. Hämagglutinations-Hemmung

Bei diesem von Adler (1,2) entwickelten Immunoassay wird Morphin als Antigenmaterial an Erythrozyten gekoppelt. Bei Abwesenheit von freiem Morphin wird es dann natürlich zur Hämagglutination kommen, die ja sehr einfach nachzuweisen ist. Ein Ausbleiben dieser Reaktion weist dann umgekehrt auf einen Verbrauch der Antikörper und so die Anwesenheit von freiem Morphin hin. Die Empfindlichkeit dieses Ansatzes ist naturgemäß sehr hoch und kann durch

Variation der Antikörpermenge in großem Maße verändert werden. Dadurch ist auch eine semiquantitative Konzentrationsbestimmung möglich. Unter durchschnittlichen Bedingungen liegt die Nachweisgrenze bei 20-30 ng/ml.

2.4.3. RIA (Radioimmunoassay)

RIA ist das heute wohl verbreitetste immunologische Verfahren zum Nachweis von Morphin in Urin, Speichel, Plasma, Vollblut und Organextrakten (10,26,27,32,33,64, 108,125,127,145). Es wird teils mit (33), teils ohne vorherige Extraktion (124,127) eingesetzt. Dabei gibt es zwei verschiedene Verfahren, die kommerziell verfügbar sind und allgemein angewendet werden. Bei dem einen ist das Antigen Morphin mit Tritium (^{3}H) markiert (33, 127). Dieses Verfahren benötigt zur Durchführung 1-2 Stunden und kommt mit 0,1 ml der zu untersuchenden Probe aus. Die Nachweisgrenze wird mit 60 ng/ml angegeben, und sowohl qualitative wie auch quantitative Aussagen sind möglich. Durch die radioaktive Halbwertszeit bedingt, ist die Verwendbarkeit der Reagentien auf 6 Monate beschränkt. Das andere Verfahren ermöglicht gleichfalls qualitative und quantitative Aussagen. Es arbeitet mit ^{125}Jod und die Durchführungszeit beträgt hier 30-60 Minuten. Die Nachweisgrenze liegt bei 40-100 ng/ml. Die Verwendbarkeitsdauer schwankt innerhalb von 2-4 Monaten nach der Jodierung (33). Cleeland e.a. (32) und Spiehler e.a. (127) weisen darauf hin, daß ^{125}Jod im allgemeinen als Marker gegenüber Tritium und ^{14}C Kohlenstoff - der auch versuchsweise verwendet wurde (84) - vorzuziehen sei, weil dieser Assay der schnellere und billigere sei, bzw., die dabei verwendete Gammazählung der Radioaktivität weniger störanfällig (zumindest bei Direktuntersuchung von Blut) sei als die Flüssigkeitszintillationszählung (59). Beim

^{125}Jod-Verfahren wird das Antigen mit 0,01 molarer, Phosphat gepufferter Salzlösung (pH 7,2) so verdünnt, daß die radioaktive Konzentration zwischen 5-70 Ci/g liegt. Das Antikörperreagenz wird nach der modifizierten Methode von Spector und Parker (125) gewonnen und später mit einer gleichen Menge Puffer verdünnt.

2.4.4. EMIT

Da es sich hierbei um eine relativ neue Methode handelt, soll sie kurz beschrieben werden.
Die Abkürzung EMIT steht für "Enzyme multiplied immunoassay technique". Bei dem hier verwendeten Verfahren handelt es sich um einen sog. homogenen Enzymimmunoassay. Er beruht auf folgendem Prinzip : Morphinmoleküle werden mit dem Enzym Lysozym (einem zellauflösenden Enzym) gekoppelt. Ferner benötigt man Antikörper gegen Morphin mit möglichst hoher Spezifität. Sodann gibt man die zu untersuchende Probe in eine Lösung mit nicht pathogenen Indikatorbakterien (Micrococcus luteus) und genau vorgeschriebenen Mengen an Lysozym-Morphin und Antikörpern. Danach mißt man im Photometer über eine bestimmte Zeit die Extinktionsänderung der Probe. Enthielt die Probe kein Morphin, so spielt sich folgende Reaktion ab: die Antikörper binden an das ans Lysozym gekoppelte Morphin und führen über eine Konformationsänderung zur Inaktivierung des Enzyms. Das Lysozym hat nicht oder nur kurz (nämlich bis zum Eintreten der Inaktivierung) Gelegenheit, Bakterien zu zerstören und es wird sich daher nur eine geringe Extinktionsänderung ergeben. Enthielt die Probe aber Morphin, so werden sich die Antikörper im Verhältnis der Mengen auf freies und auf Lysozym-Morphin verteilen. Es bleibt also nichtgeblocktes Lysozym übrig - je mehr Morphin in der Probe, desto mehr freies Lysozym -

das Gelegenheit hat, Bakterienzellen zu zerstören und damit eine Extinktionsabnahme herbeizuführen. Da das Enzym in jedem Fall bei Substratsättigung arbeitet, wird die Menge der zerstörten Bakterien - und damit die Extinktionsabnahme - der Menge an nicht blockiertem Lysozym - und damit auch der Menge Morphin in der Probe - proportional sein.

2.4.4.1. Anwendung von EMIT bei Urinuntersuchungen

Die meisten Autoren setzen den EMIT-Assay zur Bestimmung von Morphinspiegeln im Urin ein (23,56,98,113,118,130). Dabei wird der Urin direkt als zu untersuchende Probe dem Lysozym-Antikörper-Bakteriengemisch (s.o.) zugesetzt. Diese Verarbeitungsweise ist möglich, da es sich bei Urin um eine wäßrige, ziemlich lichtdurchlässige Flüssigkeit handelt. Da ja zudem Extinktionsdifferenzen bestimmt werden, spielen absolute Extinktionsunterschiede verschiedener Urine (durch Konzentrationsunterschiede) bei der Untersuchung keine Rolle. Allerdings wirken sich bei dieser Art der Untersuchung physiologischerweise im Harn manchmal vorkommende endogene Lysozymmengen sehr stark störend aus, da sie zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Dieses Lysozym unschädlich zu machen wäre ähnlich aufwendig, wie der Vorgang zur Extraktion des Morphins aus biologischem Material.

2.4.4.2. Anwendung von EMIT bei Blutuntersuchungen

Einige Autoren weisen darauf hin, daß Blutuntersuchungen mit EMIT nicht möglich seien (gemeint sind direkte), da Blut durch den roten Farbstoff eine zu geringe Transmission des Lichts aufweise und dadurch Extinktionsänderungen in der Probe nicht mehr meßbar seien (45,127).

Erst Slightom e.a. (121) wenden es auch zur Untersuchung von Blut, Galle und Geweben an. Sie schicken der EMIT-Analyse verschiedene Extraktionsverfahren mit Wiederfindungsraten von 61-94% voraus und können so Untersuchungen auf verschiedene Rauschgifte durchführen. Sie nützen die Extraktion des zu untersuchenden Materials gleichzeitig zur Konzentrierung des Stoffes und erhöhen dadurch die Nachweisempfindlichkeit. Auch können sie erstmalig Eichkurven für verschiedene Rauschgifte aufstellen, jedoch haben sie diese Kurven vereinfacht durch Lösung der entsprechenden Reinsubstanz in Aqua dest. ermittelt.
Die Spezifität des EMIT-Testes, wie übrigens aller immunologischer Verfahren, hängt von der Qualität der Antikörper ab, die deshalb immer besonderer Kontrolle bedürfen. Etwa gleich große Empfindlichkeit für Morphin und Morphinglucuronid, sowie fehlende Kreuzreaktionen mit Methadon und Dextrometorphan (einem gebräuchlichen Hustenmittel) entsprechen den Anforderungen an Antikörperreagentien für einen Opiattest.
Tabelle 1 gibt eine Übersicht möglicher Kreuzreaktionen.

2.4.4.3. Kombination von EMIT mit der Dünnschichtchromatographie (DC)

Wegen der Gefahr der falsch positiven Ergebnisse durch Kreuzreaktionen wird EMIT manchmal auch mit der Dünnschichtchromatographie kombiniert. Die DC eignet sich ja per se nicht zur quantitativen Bestimmung, aber die Empfindlichkeit des qualitativen Nachweises ist recht gut. McIntyre und Armandi (82) gaben 1976 für ihre Untersuchungen eine Nachweisgrenze von 500 ng/ml an. Bei Verwendung von Dansylchlorid, einer fluoreszierenden Markiersubstanz, konnten Picogrammengen von Morphin be-

Tab.1: Stoffe, die durch Kreuzreaktionen falsch positive Ergebnisse herbeiführen können (39)

	Gehalt, der 0,5 µg/ml Morphin vortäuscht
Codein	0,2 µg/ml
Morphin	0,5 µg/ml
Morphin Glucuronid	0,7 µg/ml
Nalorphin	1,6 µg/ml
Meperidin	31,5 µg/ml
Chlorpromazin	135,0 µg/ml
Naloxon	155,0 µg/ml
Dextrometorphan	125,0 µg/ml
Diphenoxylat	> 1000,0 µg/ml
Methadon	> 1000,0 µg/ml

stimmt werden (81). So wird die Dünnschichtchromatographie einerseits parallel zu Kontrolluntersuchungen (98, 99) eingesetzt, andererseits wird das durch die DC gereinigte und separierte Morphin dann mit EMIT quantitativ untersucht (74).

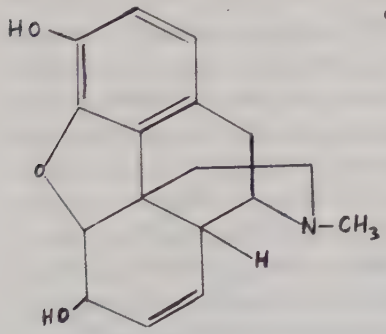
3. Stoffwechsel der Opiate

Eingehen möchte ich hier nur auf die Gruppe der natürlichen Opiumalkaloide und einiger halb- und vollsynthetischer Opiate, deren chemische Grundstruktur soweit mit der des Morphins übereinstimmt, daß zu erwarten steht, daß Umwandlungen der einzelnen Derivate ineinander im Rahmen der körpereigenen Abbauvorgänge vorkommen können. Außerdem beschränkt ja die Spezifität der Antikörper des Testsatzes die Anwendung auf Verbindungen ähnlicher Struktur. Die dafür in Frage kommenden Verbindungen sind in Abb.1 mit ihrer Struktur aufgezeichnet und die Modifikationen angestrichen.

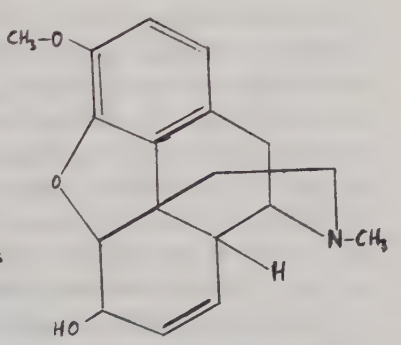
3.1. Metabolismus

Morphin wird zum größten Teil durch Umwandlung zum 3- Monoglucuronid in der Leber inaktiviert. Ein kleiner Teil (4%) wird zu Normorphin demethyliert, das sowohl frei (1%) als auch konjugiert (3%) vorkommt (140). Sowohl freies (10%) als auch konjugiertes (65%) Morphin werden mit dem Urin ausgeschieden. Ein kleiner Anteil (1o%) wird mit den Faeces nach Ausscheidung in die Gallenflüssigkeit eliminiert (77). Oguri et al. (101) fanden in 35-Stunden Sammelurin außerdem noch Morphin-6-glucuronid. Sowohl S. Yeh (142) als auch Brunk und Delle (25) gelang es, zusätzlich noch Morphinäthersulfat nachzuweisen.
Weithin umstritten ist in der Literatur aber, ob beim Abbau von Morphin Codein entsteht. Nachdem Elison und Elliot (56) die O-Methylierung im Stoffwechsel des Morphins bei der Ratte und dem Hund postuliert hatten, stellten Boerner und Abbott (12) die Biotransformation des Morphins in Codein beim Menschen fest. Doch diese

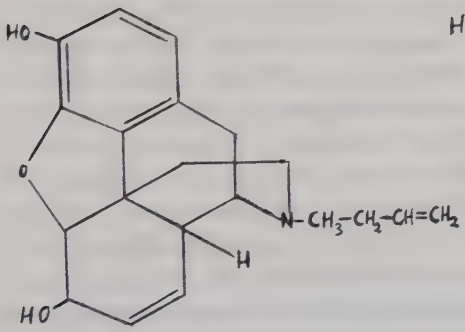
Abb.1: Struktur d. Morphins und verwandter, bzw. kreuzreagierender Substanzen



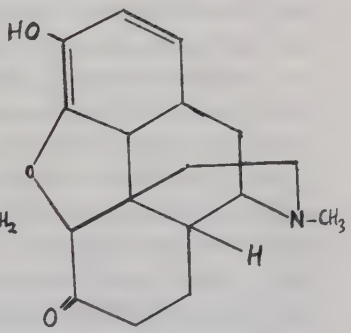
Morphin



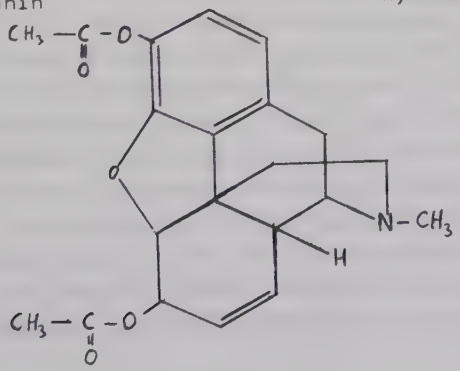
Codein



Nalorphin



Hydromorphon



Heroin

Ergebnisse konnten im weiteren weder durch Yeh (141,143) noch durch Yong und Lik (146) bestätigt werden. Vielmehr glaubt Yeh, daß es sich um Codeinverunreinigungen des angewandten Morphinsulfats handelt (Yeh: Codeinverunreinigung von U.S.P. grade Morphinsulfat beträgt 0,04%). Boerner et al. (17) bemängelten, daß bei den Versuchen von Yeh und Yong & Lik keine chronische Anwendung der Droge erfolgte, was durchaus zu Veränderungen im Metabolismus führen könnte. Außerdem ist es denkbar, daß neue Abbauwege durch Enzyminduktion quantitativ an Bedeutung gewinnen könnten und dadurch überhaupt erst bemerkt werden. Ähnliches ist auch über den umstrittenen Nachweis von Norcodein (64) zu sagen. Da auch in diesem Fall Morphinsulfat verwendet wurde, könnte das Norcodein aus den Codeinverunreinigungen entstanden sein. Erklärend weisen auch Yong und Lik darauf hin, daß sie nicht nur Unterschiede in der Ausscheidung bei verschiedenen Personen, sondern auch bei denselben Personen an verschiedenen Tagen und zwar sowohl in qualitativer wie quantitativer Hinsicht (Schnelligkeit des Abbaus) festgestellt haben. Sie folgern daraus, daß eine Person je nach körperlicher Verfassung unterschiedlich reagieren kann. Sie halten die Abbauvorgänge für genetisch fixiert und für ein Charakteristikum eines jeden Individuums. Doch selbst wenn man also davon ausgeht, daß das gefundene Codein und Norcodein durch Biotransformation bei Personen mit genetischen Spielarten der normalen Abbauvorgänge entstanden ist, so sind doch die gefundenen Mengen zu gering (nämlich um etwa 1% der applizierten Morphinmenge (15)), als daß sie das Ergebnis einer Analyse wesentlich verfälschen könnten.
Codein wird weitgehend, d.h. zu ca. 90% im Körper metabolisiert (13,136,138,141,147). Dabei ist die Biotransformation von Codein in Morphin durch O-Demethylierung

durchaus ein metabolischer Prozeß, der ins Gewicht fällt. So fanden Adler e.a. (3) nach Anwendung von (N-^{14}C) Methylcodein 11% unverändertes, 45% konjugiertes Codein, 14% Gesamt-Norcodein und 10% Gesamt-Morphin. Yong und Lik (146) konnten sogar bis zu 25% Morphin in der Urinausscheidung nachweisen. Moosmayer und Besserer (89) wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, daß sich das Verhältnis von Codein- zu Morphinkonzentration im Urin auf Grund der verschiedenen Eliminationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Zeit laufend ändert. 27-30 Stunden nach Codeinapplikation fanden sich Morphinkonzentrationen, die deutlich über denen der Codeinwerte lagen, und wenn die Codeinmenge unter die Nachweisgrenze gefallen war, konnte immer noch Morphin allein nachgewiesen werden.

Nach dem Genuß von Opium (gleichgültig ob oral oder durch Rauchen zugeführt) liegt die Ausscheidung von Codein im Vergleich zu Morphin wesentlich höher als nach dem Mischungsverhältnis der beiden Alkaloide im Opium selbst zu erwarten wäre (146). Dies scheint nach Yong und Lik anzudeuten, daß in diesem Falle die Ausscheidung von Codein der wirksamere Mechanismus ist.

Heroin (Diacetylmorphin) wird leicht (Halbwertszeit $T_{1/2}$ 9 Minuten) zu Monoacetylmorphin ($T_{1/2}$= 38 Minuten) und dann zu Morphin hydrolysiert (93,146). Diese Hydrolyse, die eine Desacetylierung beinhaltet, ist ein ständig ablaufender metabolischer Prozeß (20,34,51,62,106). So ist es nach dem Gebrauch von Heroin zwar möglich, die Ausscheidung von Morphin nachzuweisen, der Nachweis von Monoacetylmorphin und erst recht Heroin selbst ist jedoch sehr schwierig, da die Hydrolyse fast vollständig abläuft. Allerdings muß man in praxi auch immer mit dem Auftreten von Codein rechnen, da es eine häufige Verunreinigung von illegal hergestelltem Heroin darstellt (

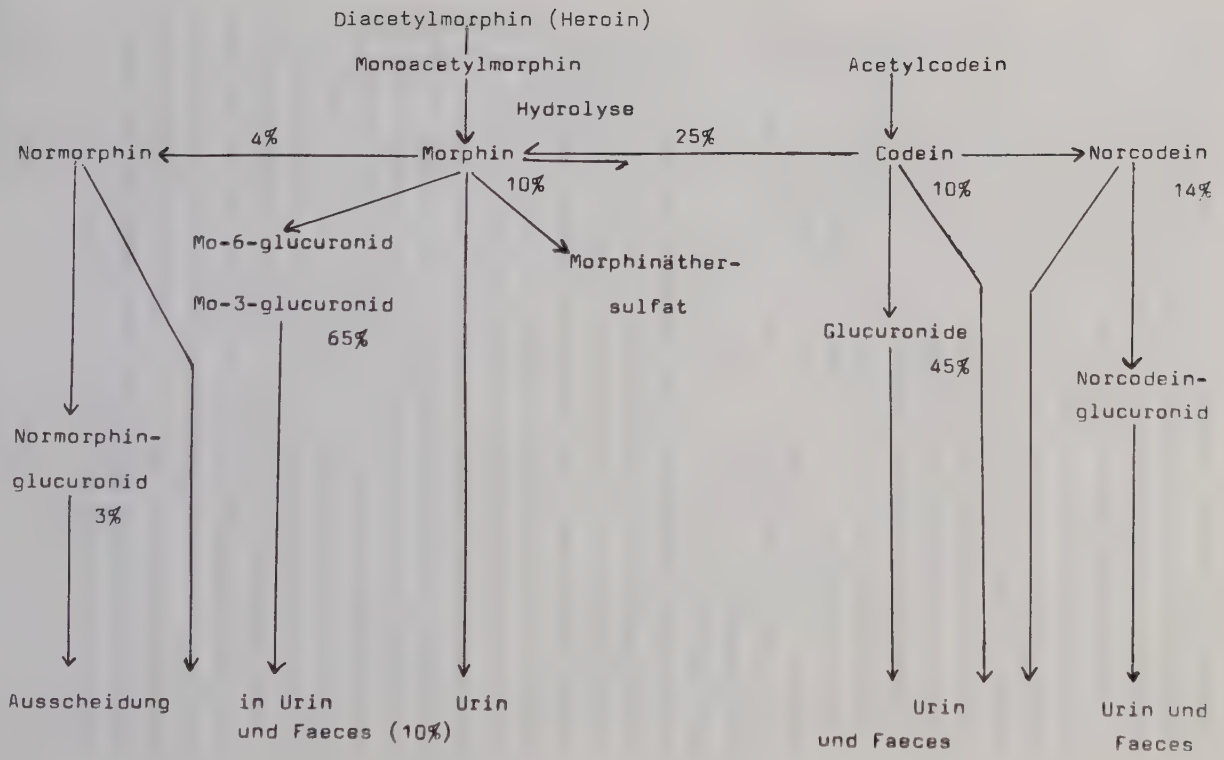


Abb. 2: Stoffwechselwege des Heroins

11,56,84).
Nach diesen Ausführungen zum Metabolismus der Opiate erscheint es wichtig, auch noch speziell auf die Pharmakokinetik einzugehen. Dabei dürfte wohl die Betrachtung der beiden wichtigsten Komponenten des Morphinstoffwechsels, des freien Morphins und des Morphinglucuronids ausreichend sein.

3.2. Pharmakokinetik

Zuerst möchte ich auf einige Besonderheiten bei oraler Anwendung des Morphins hinweisen:
Bei oraler Applikation läßt sich keine sicher vorhersehbare Wirkung erzielen (77), obwohl Morphin gut im Magen-Darm-Trakt resorbiert wird. Es wird nämlich in den Zellen der gastrointestinalen Mukosa und in der Leber so schnell zu Morphin-glucuronid konjugiert, daß signifikante Spiegel von freiem Morphin weder im Plasma noch im Urin gefunden werden können, während gleichzeitig der Spiegel des konjugierten Morphins hoch ist. Diese Tatsache war schon vor dem experimentellen Nachweis durch Brunk und Delle (25) hinlänglich aus der praktischen Erfahrung der therapeutischen Anwendung bekannt und es wird deswegen verschiedentlich (77) darauf hingewiesen, daß bei oraler Gabe Alternativopiate dem Morphin vorzuziehen seien. Außerdem ist die N-Demethylierung zu Normorphin nach oraler Anwendung größer als nach parenteraler.
Die Plasmaspiegel nach intramuskulärer oder subkutaner Injektion sind signifikant höher als nach intravenöser Gabe. Das i.v. verabreichte Morphin bringt zwar anfänglich höhere Werte, unterliegt dann aber einer schnelleren Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung (25). Während die Art der Anwendung zwar die Plasmaspiegel an

freiem Morphin verändert, hat sie jedoch keinen Einfluß auf die Plasmahalbwertszeit. Sie lag durchschnittlich bei zwei Stunden, variiert aber von Individuum zu Individuum ganz beträchtlich (30-240 Min.)(9,25).
Berkowitz e.a.(9) fanden außerdem, daß die Maxima der Serumwerte abhängig vom Alter waren, wobei die älteren Versuchspersonen durchschnittlich 70% höhere Werte aufwiesen als die jungen. Diese Ergebnisse bestätigen, was man schon in zahlreichen Tierversuchen gefunden hatte (83,140). Aber auch dieser Faktor beeinflußte die Plasmahalbwertszeit nicht.
Dahlström e.a. untersuchten die Kinetik des Morphinstoffwechsels bei Kindern. Es zeigte sich, daß ihre Ergebnisse weitgehend mit dem übereinstimmten, was Brunk und Delle und andere gefunden hatten (64,126,128). Im Gegensatz zu Johanneson, Becker (69) und Woods (140) bei ihren Rattenversuchen konnten sie keine altersabhängigen Unterschiede der Morphinkinetik gegenüber der Altersgruppe 20-50 Jahre (9) feststellen und auch bei Aufteilung der Kinder in Untergruppen zeigten sich keine signifikanten Abweichungen.
Abbildung 3 zeigt das Verhalten des Plasmaspiegels an freiem Morphin bei vier verschiedenen Arten der Applikation. Daraus wird ersichtlich, daß die Anwendungsart, von den oben angeführten Besonderheiten abgesehen, von untergeordneter Bedeutung ist. In jedem Fall wird der höchste Punkt nach 1-1,5 Stunden erreicht. Danach ergibt sich ein exponentieller Abfall der Konzentrationen an freiem Morphin. Abbildung 4 zeigt das Verhalten des Plasmaspiegels von konjugiertem Morphin. Dabei fällt auf, daß der Rückgang hierbei nicht exponentiell ist. Allerdings ist schon durch die Untersuchungen von Hug e.a.(65) und Milne e.a.(86) bekannt, daß freies Morphin offensichtlich von den Tubuluszellen der Niere aktiv sezer-

Plasmaspiegel nach Gabe von 10 mg/70 kg Morphin

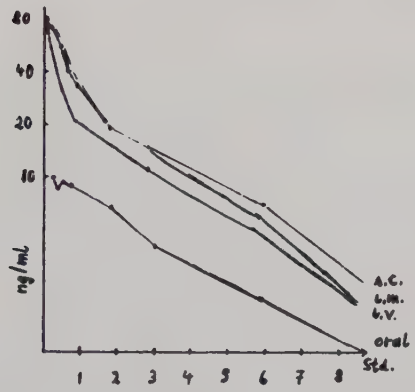


Abb.3 und 4 nach Brunk u. Delle (25)

Abb.3: freies Morphin

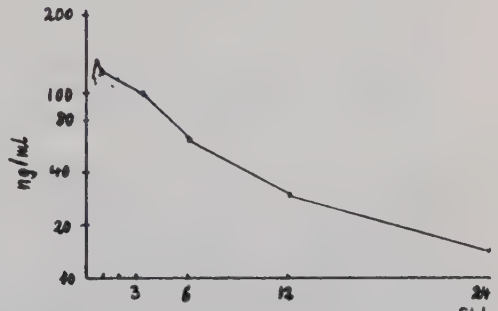


Abb.4: konjugiertes Morphin

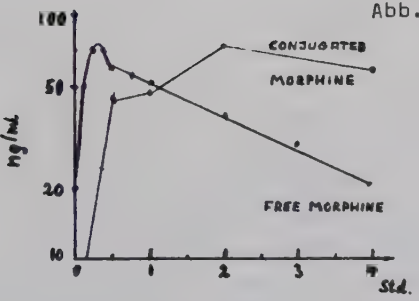


Abb.5 nach Berkowitz e.a. (10)

niert wird, denn die Clearance dafür ist deutlich höher als die von Inulin. Auf der anderen Seite ist die von Morphinglucuronid kleiner als die von Inulin, was für eine Rückresorption des Konjugats in der Niere spricht. Innerhalb des Körpers findet auch eine rege Umverteilung des Morphins statt (25). Wie die Plasmaspiegel im Vergleich zur Gesamtmenge der verabreichten Droge schon erwarten lassen, neigt das Morphin dazu, die Blutbahn zu verlassen und sich in verschiedenen Geweben, wie Leber, Lunge, Milz, Nieren und Muskeln anzureichern. Obwohl die Konzentration des Morphins im Muskel wesentlich geringer ist als in den Organen, so enthält er doch, entsprechend seiner größeren Masse, auch einen sehr hohen Teil des im Körper vorhandenen Morphins. Nur relativ kleine Mengen an Morphin überschreiten die Blut-Hirn-Schranke. Wesentlich besser überwindet Monoacetylmorphin (Spaltprodukt des Heroins) diese Schranke (97,146). Das erklärt auch den sogenannten Anströmeffekt bei intravenöser Applikation von Heroin und seine niedrigere Letaldosis (73). Robinson und Williams (112) haben ausführliche Untersuchungen der Morphinverteilung an Drogentoten vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß Morphin sowohl frei als auch gebunden (in Proteinbindung oder konjugiert) in den einzelnen Geweben angereichert wird. So fanden Garrett und Gürkan (53) heraus, daß stabilisiertes Heroin im Blut zu einem erheblichen Teil an die Membranen von Erythrozyten angelagert wird. Dabei schwanken die Zahlen bei ihrer Untersuchung von Hundeblut zwischen 50-60%. Von dem restlichen im Plasmawasser befindlichen Heroin sind wiederum ca. 40% an Plasmaproteine gebunden.
Die höchsten Organkonzentrationen von Morphin werden nach Robinson und Williams (112) naturgemäß in der Leber (1,0-20,5 µg/g) gefunden. Ob Morphin im Blut nachweisbar ist oder nicht, hängt weitgehend von der Über-

lebenszeit nach der Applikation ab. Die Konzentration entspricht im allgemeinen etwa der, die im Muskel gefunden wird (104) und ist in den meisten Fällen jedoch deutlich geringer als in der Leber, ja auch als in der Niere, die meistens die zweithöchsten Werte erreicht (von 0,4-17,8 µg/g). Im Gehirn war Morphin nur in zwei Fällen extrem hoher übriger Organkonzentrationen nachweisbar. Dafür konnte es aber andererseits sogar in Hämatomblut und Haaren (54), nicht dagegen in Glaskörperflüssigkeit (16) nachgewiesen werden.
Oft ist auch eine Untersuchung der Galle recht nützlich, da hier von der Leber gebildetes Glucuronid (ca. 10%) gespeichert wird (110). Auf Grund des enterohepatischen Kreislaufs kann man manchmal extrem hohe Konzentrationen nachweisen. Auch kann man hier oft noch Spuren finden, wenn es sonst schon aus dem Körper verschwunden ist. Umgekehrt kann man bei kurz vorhergegangener Applikation nach mehrtägiger Pause natürlich noch nichts nachweisen.

3.3. Therapeutische Dosierung und Letaldosis von Morphin

Die therapeutische Dosis von Morphin liegt im Bereich von 7-15 mg pro Normalperson, wobei diese teils mit 70 kg Körpergewicht (9), teils mit 1,73 m^2 Körperoberfläche (25) definiert wird. Diese Dosierung entspricht Blutkonzentrationen von initial ca. 300 ng/ml (64). Analgesie beginnt nach den Untersuchungen von Dahlström e.a. und Berkowitz e.a. (9) bei Blutwerten von ca. 65 ng/ml.
Will man nun für Morphin eine Letaldosis festsetzen, so erweist es sich als sehr schwierig, allgemein gültige Werte aufzustellen, denn es gibt da ganz erhebliche Schwankungen. Da der Mensch erhebliche Toleranz (angeblich bis zum 200-fachen der für nicht tolerante Personen tödlichen Menge) gegenüber dieser Droge zu entwickeln

vermag, läßt sich nur schwer eine Grenze festlegen, ab der eine Morphinkonzentration sicher tödlich ist. Im allgemeinen jedoch geht Klug (73) davon aus, daß eine Dosis von 100 mg i.v. oder 300-400 mg oral als tödlich anzusehen sei. Allerdings weist er darauf hin, daß bei Einsatz von Opiumtinktur die Letaldosis bezogen auf Morphin auf die Hälfte sinkt und zwar auf Grund der Wirkungsverstärkung durch Nebenalkaloide. Für Heroin werden ebenfalls niedrigere Werte, etwa 50-60 mg (73, 101) angegeben; vor allem erklärt sich das wohl aus der besseren Hirngängigkeit von Monoacetylmorphin. Gleichzeitig werden große individuelle Schwankungen eingeräumt: während Süchtige bis zu 5,5 g/24 Std. (73, 79) vertragen sollen, können für Herzkranke und Asthmatiker bereits therapeutische Gaben tödlich sein.
Die tödliche Mindestmenge, bezüglich gemessener Organwerte, dürfte für einen nicht toleranten Organismus nach den Untersuchungen von Felby, Christensen und Lund (46) bei 0,2 µg/g Blut liegen. Dies konnte man bei den häufigen Todesfällen von Fixern feststellen, die nach mehrwöchigem Entzug und damit verbundenem Toleranzverlust mit einer zu großen Dosis wieder einstiegen. Die Höchstwerte lagen bei 1 µg/g Blut und 21 µg/g Leber nach Robinson und Williams (112) bzw. bei 2,8 µg/g Blut und 18 µg/g Leber nach Felby e.a. (46). In dem Fall mit der Blutkonzentration von 2,8 µg/g muß man anmerken, daß es sich dabei um eine Kohlenmonoxidvergiftung handelte, die extrem hohe Morphinkonzentration also vom Körper toleriert wurde! Die von anderen Autoren (33,84, 93,104) gefundenen Organkonzentrationen und Letaldosen liegen auch nach nasaler Applikation in den oben genannten Bereichen; Richards e.a. (111) konnten bei ihrer groß angelegten Studie von 114 Todesfällen nach Heroinmißbrauch keine höheren Werte nachweisen. Allerdings

spielt die Überlebenszeit nach Injektion der Droge eine entscheidende Rolle für die Blutkonzentration, wie aus den Studien der Kinetik hervorgeht (initiale Umverteilungsphase: Plasmahalbwertszeit 5 Min.). Deshalb berücksichtigten Richards e.a. (111) die Überlebenszeiten in ihrer Studie gesondert und machten eine interessante Feststellung: Sie fanden in mehreren Fällen trotz sehr kurzer Überlebenszeiten Blutkonzentrationen, die - auch andere Drogen waren nicht nachweisbar - absolut unter den tödlichen Dosen lagen (0,02- 0,12 µg/g Blut) und zwar bei völlig fehlendem Nachweis im Urin. Da aber die Ausscheidung von Morphin in den Urin innerhalb von 6 Minuten nach der Injektion beginnt (43), bleibt als Erklärung für das Fehlen von Morphin im Urin nur ein plötzlicher und intensiver kardiovaskulärer Kollaps mit fehlender Durchblutung von Leber und Nieren (6,70). Diese Fälle haben Anlaß für viele Spekulationen gegeben. So wurde oft eine allergische Reaktion des Körpers dafür verantwortlich gemacht, um so mehr als bekannt ist, daß schon kleine Mengen von Procain bei überempfindlichen Leuten toxische Reaktionen hervorrufen können, und Procain - neben anderen Verunreinigungen - fast immer im Heroin der westlichen USA gefunden wird (31,44,108). Andererseits konnte keine auffallende Gewebeeosinophilie nachgewiesen werden, um diese Theorie zu bestätigen (52). So wurden dann auch Chininverunreinigungen verdächtigt, Herzrythmusstörungen hervorzurufen (80,103) und auf diese Weise zu den plötzlichen, unerklärbaren Todesfällen beizutragen. Aber auch dafür konnten Garriott und Sturner (52) kein Gewebekorrellat entdecken. Sie unterstützen vielmehr zusammen mit Elison und Eliott (42) die Theorie von Fraud, Shim und Williams (51), daß direkte toxische Effekte der Droge auf die glatten Muskeln der alveolären Kapillaren der Lunge für den Tod verant-

wortlich sind. Richards e.a. halten die Existenz eines kurzlebigen Immunglobulins gegen Morphin für wahrscheinlich, das in einigen Fällen die tödliche Gewebereaktion hervorruft. Untersuchungen von Weksler e.a.(139) zeigten, daß bei Abhängigen ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentrationen an IgA, IgG und IgM gegenüber Normalpersonen festgestellt werden kann. Eine Erhöhung der Morphinbindungskapazität der Plasmaproteine - eine ursprünglich für dieses Phänomen angenommene Erklärung - trat dagegen nicht auf.
Die Literaturuntersuchung macht deutlich, daß das Phänomen "Drogentod" von erheblicher Komplexität ist. Aber es lassen sich immerhin deutlich zwei Arten unterscheiden: der plötzliche Tod mit noch umstrittener Ursache, und die langsame komatöse Form, die Tage dauern kann und auf der atemdepressiven Wirkung des Morphins beruht. Während Garriott und Sturner verschiedene Morphinkonzentrationen als Kriterium für die Überlebenszeit aufstellten, konnten Richards e.a. und Adler e.a.(3) keine Korrellation von Blutspiegeln und Überlebenszeiten feststellen.
Abschließend kann man bemerken, daß Gewebekonzentrationen allein nicht immer die nötige Information bieten. Hohe Morphinwerte machen zwar die Diagnose Überdosierung wahrscheinlich, bei niedrigen Werten müssen aber auch andere Kriterien in Betracht gezogen werden.

4. Ergebnis der Literaturübersicht

Es sind in der Literatur einige Verfahren zum Nachweis von Opiaten in biologischem Material beschrieben. Bei näherer Betrachtung weisen aber die meisten von ihnen mehr oder weniger große Schwächen auf. So erlaubt die Dünnschichtchromatographie überhaupt keine quantitative Bestimmung, FRAT wurde bisher nur für Urinuntersuchungen verwendet und die Spektrophotometrie ist sehr arbeitsintensiv. Gaschromatographische Verfahren weisen zwar eine sehr hohe quantitative Genauigkeit auf, doch erfolgt die qualitative Identifizierung nicht mit der nötigen Sicherheit, so daß sie mit anderen Verfahren kombiniert werden müssen. Außerdem sind die beiden besten GC-Verfahren, nämlich mit Elektroneneinfangdetektor und mit Massenspektrometrie, sehr aufwendig.
Nachdem EMIT dem RIA vom Aufbau her - beides sind Immunoassays - sehr ähnelt und RIA allgemein hoch zufriedenstellende Ergebnisse lieferte, so stellt sich die Frage, ob es sinnvoll ist, ein weiteres, ähnliches Verfahren zu entwickeln bzw. den Anwendungsbereich zu erweitern. Unter dieser Praemisse erscheint es sinnvoll, die beiden Verfahren etwas ausführlicher gegenüber zu stellen und zu vergleichen.
Der wichtigste Vorteil von RIA ist wohl heute noch, daß man schon auf eine jahrelange Erfahrung zurückgreifen kann, die bei EMIT zweifellos noch fehlt. Im allgemeinen kann man auch feststellen, daß die RIAs etwas empfindlicher sind als analoge EMIT Tests.
Des weiteren kann der RIA bei Blutuntersuchungen direkt angewendet werden, während bei EMIT ein Extraktionsschritt vorausgehen muß. Allerdings wird auch bei RIAs gerne ein Extraktionsverfahren vorangesetzt, da z.B. bei stark hämolysiertem Blut Interferenzen mit dem Assay

beobachtet wurden. Zudem benötigt RIA ein mehr oder weniger aufwendiges Verfahren zur Trennung von freiem Antigen und Antigen/Antikörper-Komplex. Dieser Schritt entfällt bei der EMIT-Technik. Ein weiterer Vorteil von RIA wäre an sich, daß die Markierung mit Radionukliden einfacher ist als mit Enzymen. Doch gerade diese radioaktive Markierung der Wirkstoffe wirft auch eine Fülle von Problemen auf. Alle verwendeten Radionuklide haben, durch die radioaktive Halbwertszeit bedingt, eine sehr begrenzte Lebensdauer. So muß man einen gewissen Verlust bei den übrigbleibenden Wirkstoffen immer mit einkalkulieren. Zudem sind wegen der umweltbelastenden Radioaktivität aufwendige Maßnahmen zum Schutz der Umwelt und des Laborpersonals notwendig. Es bestehen behördliche Bestimmungen und Auflagen hinsichtlich der radioaktiven Wirkstoffe. RIAs können auch nur von Personen durchgeführt werden, die im Besitz einer Umgangsgenehmigung für radioaktive Reagentien sind (§3 d. 1. Strahlenschutzverordnung). Probleme bei der Abfallbeseitigung - auch verbrauchte strahlende Substanzen unterliegen noch den Sicherheitsbestimmungen - sind oft nur schwer lösbar. Außerdem erfordert die Einführung von RIA in ein Labor die Anschaffung eines Gammacounters, während die für EMIT nötigen Geräte in den meisten Labors ohnehin vorhanden sind. Damit dürfte wohl deutlich werden, daß RIA auch in Zukunft nur auf große Labors beschränkt bleiben wird, die die Möglichkeiten haben, die zahlreichen Vorbedingungen im Umgang mit der Radioaktivität zu erfüllen. Dagegen eignet sich die EMIT-Technik gut auch für kleinere Labors, besonders bei entsprechender Würdigung des Kostenfaktors.

5. Eigene Untersuchungen

In dieser Arbeit sollte ein brauchbarer Ansatz zur quantitativen Bestimmung von Morphin im Blut mittels eines enzymimmunologischen Verfahrens erarbeitet werden. Da EMIT nicht zur Untersuchung von Blut direkt angewandt werden kann, gehörte zu der Arbeit auch das Auffinden einer schnellen und effektiven Extraktionsmethode. Damit sollten dann quantitative Untersuchungen von Blutproben Toter, die zur gerichtsmedizinischen Untersuchung ins Institut für Rechtsmedizin der LMU München gebracht wurden und deren Todesursache vermutlich auf Drogenmißbrauch zurückzuführen war, vorgenommen werden.

5.1. Extraktionen

Im Gegensatz zu Versuchen der Literatur (121) wurden in dieser Arbeit keine Extraktionen aus wässerigen Lösungen und Plasma, sondern ausschließlich Extraktionen aus Vollblut untersucht - wegen der Tatsache, daß Morphin an die Membranen der Erythrozyten (53) angelagert wird.
Die von Slightom (121) vorgeschlagene flüssig-flüssig Extraktion ist sehr zeitaufwendig und führt zu wechselnden Ausbeuten, auch je nach Sorgfalt der Ausführung. Deshalb wurden hier nur Säulenextraktionen untersucht. Das für die Untersuchungen nötige "Leer"blut stammte von Leichen des Sektionsmaterials des Instituts, bei denen auf Grund der Anamnese nicht mit dem Vorhandensein von Morphin, sei es therapeutischen oder sei es mißbräuchlichen Ursprungs, zu rechnen war. In vielen Fällen wurden die Asservate vorher noch dünnschichtchromatographisch auf Negativität bezüglich Morphin untersucht. Dieses Blut wurde dann mit abgemessenen Mengen

an Morphin-Hydrochlorid versetzt.

5.1.1. Amberlite xAD-2

Erste Versuche wurden mit Amberlite xAD-2 gefüllten Säulen unternommen (54,55). Jeweils 4 ml Blut wurden mit 16 ml Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer versetzt und damit auf einen pH von ca. 9,5 gebracht, der auf Grund der amphoteren Eigenschaften des Morphins zur Extraktion und zur Hämolyse am günstigsten ist. Die Hämolyse ist nötig, da 50-60% des Morphins sich an Erythrozytenmembranen anlagert (53). Im Bedarfsfall wurde das Blut/Puffer-Gemisch mit einem Ultraturrax homogenisiert. Trotzdem kam es zum Verstopfen der kommerziell erhältlichen Brinkmann Drug Skreen Säulen. Deshalb wurde bald auf Extrelut-Säulen umgestellt.

5.1.2. Extrelut

Extrelut sind mit Kieselgur gefüllte Säulen. Sie wurden nach Vorschrift des Herstellers angewandt. Zur schnelleren und gründlicheren Verteilung des nach obiger Beschreibung hergestellten Blut/Puffer-Gemisches auf die Säulen erwies sich der Einsatz einer Wasserstrahlpumpe als nützlich. Anschließend wurde das Morphin mit 60 ml Diäthyläther/Äthylacetat im Verhältnis 1:1 heruntergewaschen. Dieses Gemisch mit dem gelösten Morphin wurde mit einigen Tropfen methanolischer Salzsäure angesäuert und dann eingedampft. Leider zeigte sich, daß häufig beim "Waschen" der Säule mit dem lipophilen Lösungsmittel neben dem Morphin auch beträchtliche Mengen an Fett aus dem Blut extrahiert worden waren und nach dem Eindampfen mit dem Morphinsalz zurückblieben. Da dieses Fett dann bei der EMIT-Untersuchung zum Teil erheblich

störte, wurde versucht, das Morphin aus dem Diäthyläther/Äthylacetat-Gemisch mit Hilfe verdünnter Salzsäure auszuschütteln und so das Fett zu eliminieren. Gleichzeitig wäre durch Umgehung des Eindampfens der zeitraubendste Schritt der Extraktion weggefallen und eventuelle Verluste von Morphin durch Adsorption an die Glaswand wären vermieden worden.
Durch Titration wurde ermittelt, daß der zur EMIT-Analyse verwendete Puffer (siehe 5.3. Arbeitsvorschriften) höchstens 50 µl einer 0,01 normalen Salzsäurelösung verträgt. Bei höherer Säurekonzentration wird das Enzym gehemmt. Deshalb wurde das Eluat mit 500 µl einer 0,01 normalen HCl-Lösung extrahiert und 25 µl dieser Lösung unmittelbar zur Analyse eingesetzt. Tabelle 2 zeigt je ein Beispiel für die mit beiden Verfahrensweisen, die in Abbildung 7 noch einmal graphisch dargestellt sind, erzielten Resultate. Sie wurden mit Computerunterstützung aus einer logit/log transformierten Regressionsgeraden (siehe auch 5.2.4. Auswertungsverfahren) errechnet. Bei vergleichender Betrachtung wird besonders hinsichtlich der Werte für die Stützstellen erkennbar, daß mit dem Ausschütteln in HCl eine gute Korrelation erzielt wurde, jedoch fällt gegenüber der Eindampfmethode die wesentlich geringere Steigung auf. Auch in der in Abbildung 6 dargestellten, durch polygonale Interpolation (siehe 5.2.4.) ermittelten Eichkurve wird dieser auffallend flache Kurvenverlauf deutlich. Dies weist auf eine unzureichende Extraktion des Morphins mit der schwach salzsauren Lösung hin und da deren Konzentration aus den oben genannten Gründen nicht gesteigert werden konnte, mußten diese Verluste wesentlich größer bleiben als die durch die eventuelle Adsorption des Morphins an die Glaswand nach dem Eindampfen.
So konnte also, insgesamt gesehen, auf diese Weise keine

Tab.2: Gegenüberstellung der beiden Extraktionsweisen

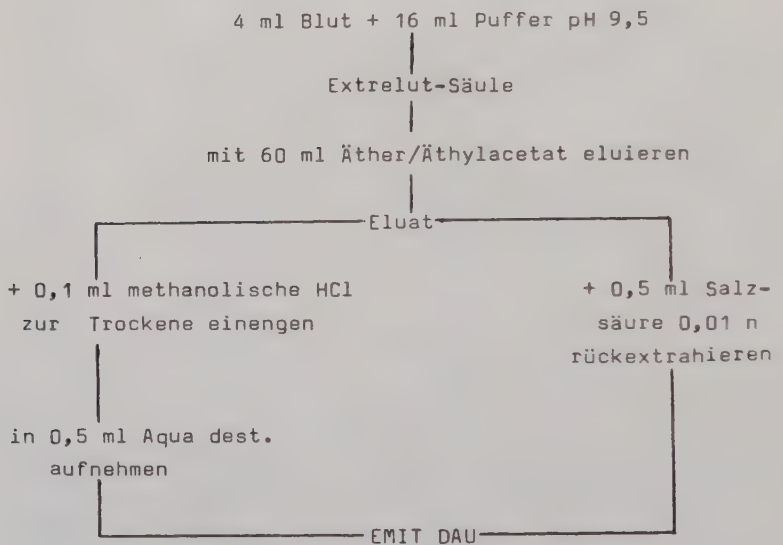
	Eindampfmethode	Ausschütteln in HCl
Regression	0,964	0,309
Korrelation	0,9864	0,9989

Konzentration ng/ml	wiedergefunden ng/ml		Variationskoeffizient			
	x	$\bar{x}$	Vk	x	$\bar{x}$	Vk
50	46 36 52	45	21%	46 56 42	49	14%
100	122 105 82	105	19%	91 140 91	107	27%
200	212 234 289	245	15%	237 194 207	213	10%
500	407 499 390	432	14%	538 505 423	488	15%

Abb.6: Eichkurve (Ausschütteln in HCl)

Verbesserung erzielt werden, obwohl das eigentliche Ziel, die Fetteliminierung, 100%-ig erreicht wurde.

Abb.7: Arbeitsmethode



Der nächste Versuch war, die Säule mit größeren Mengen des Puffers zu spülen. Auch dadurch wurde das Fett entfernt, jedoch enthielt dann das Eluat erhebliche Mengen an Ammoniumchlorid, das dann, wie schon durch die Untersuchung von Kim und Cerceo (72) bekannt, die EMIT-Analyse bis zur völligen Unbrauchbarkeit störte.
Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß vor allem Extrakte aus altem, geronnenem oder sich zersetzendem Blut die starken Fettbeimengungen aufwiesen. Deshalb wurde von da an das asservierte Blut bis

zur Untersuchung in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt. So konnten dann, trotz dieser an sich nicht ganz befriedigenden Situation, brauchbare Analysen angesetzt werden. Die Eindampfmethode wurde somit ohne weitere Änderungsversuche beibehalten.

5.2. EMIT - Untersuchungen

5.2.1. Effektivität der Extraktion

Zunächst erschien es wichtig, die Effektivität der Extraktion aus dem Blut zu untersuchen. Deshalb wurde ein Vergleich zweier Eichkurven aufgestellt:

a. Untersuchung der in beschriebener Weise extrahierten Blutproben
b. Analyse von wässerigen Morphinlösungen derselben Konzentrationen

Dabei konnten Ausbeuten von ca. 60% gefunden werden. In einem anderen Fall stiegen die Wiederfindungsraten von 41% (bei Konzentration 125 ng/ml) über 68% (250 ng/ml) auf 75% (bei 500 ng/ml). Daraus und aus dem fast parallelen Kurvenverlauf in Abbildung 8 kann man folgern, daß bei der Extraktion eine gewisse feste Menge Morphin in der Säule zurückbleibt, die nicht mit der in der zu extrahierenden Blutprobe enthaltenen Morphinkonzentration steigt. In Anbetracht des Bereiches, in dem die im allgemeinen zu erwartenden Blutkonzentrationen bei Drogenzwischenfällen liegen, kann man die Ausbeute als ausreichend betrachten.

5.2.2. Extraktionen zur Erstellung von Eichkurven

Es wurden nun, wie schon zur Untersuchung der Extraktionseffektivität, Extraktionen aus mit Morphin versetztem Leerblut unternommen und versucht, eine Eichkurve aufzustellen. Dabei ergab sich eine relativ gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, aber sehr hohe Leerextinktionen. Zudem waren die Extinktionsunterschiede zwischen niedrigen und hohen Konzentrationen zu gering, so daß kleinen Streuungen der EMIT-Werte hohe Variationskoeffi-

Abb.8: Effektivität der Extraktion

zienten bei den umgerechneten Konzentrationswerten entsprachen. Tabelle 3 und Abbildung 9 zeigen ein Beispiel für solche Eichkurven.

5.2.2.1. Untersuchung möglicher Fehlerquellen

Da manchmal Störungen der Reproduzierbarkeit auftraten, die Ursachen in der technischen Durchführung der Analyse vermuten ließen, erfolgte eine Untersuchung diesbezüglich möglicher Fehlerquellen: es wurde die Pumpengenauigkeit, die Bakteriensuspension bezüglich Substratsättigung des Lysozyms untersucht und die Konzentration der eingesetzten Morphinlösung überprüft.

5.2.2.2. Hohe Leerextinktionen

Die sehr hohen Leerextinktionen ließen sich relativ gut verbessern: Zum einen wurde durch einen frühen Ansatz der Antikörperlösung erreicht, daß die hemmende Wirkung besser und gleichmäßiger zur Anwendung kam, zum anderen wurde der Beginn der Meßzeit gegenüber dem Zeitpunkt der Einspritzung um 15 Sekunden zurückverlegt. Da die Einspritzung von Antikörperlösung und Lysozymlösung ja gleichzeitig erfolgt, ist immer eine gewisse Basisaktivität des Lysozyms bis zum völligen Ablauf der Antigen/Antikörper-Reaktion vorhanden. Durch die Zurückverlegung des Meßbeginns wurde erreicht, daß die Extinktionsänderung, die durch diese Basisaktivität verursacht wird, weitgehend aus der Messung herausfällt.

5.2.2.3. Steigung

Um die zu geringe Steigung zu vergrößern, wurde das Verhältnis an eingesetztem Lysozym/Antikörpergemisch verän-

Tabelle 3: Werte der Eichkurve und Fehlerberechnung

ng Morphin/ml	gefunden x	$\bar{x}$	V_k
	38		
	53		
50	40	47	19,5%
	57		
	129		
	114		
100	124	112	13,3%
	110		
	85		
	235		
	200		
200	237	224	8,3%
	240		
	208		
	279		
300	277	271	5,8%
	251		

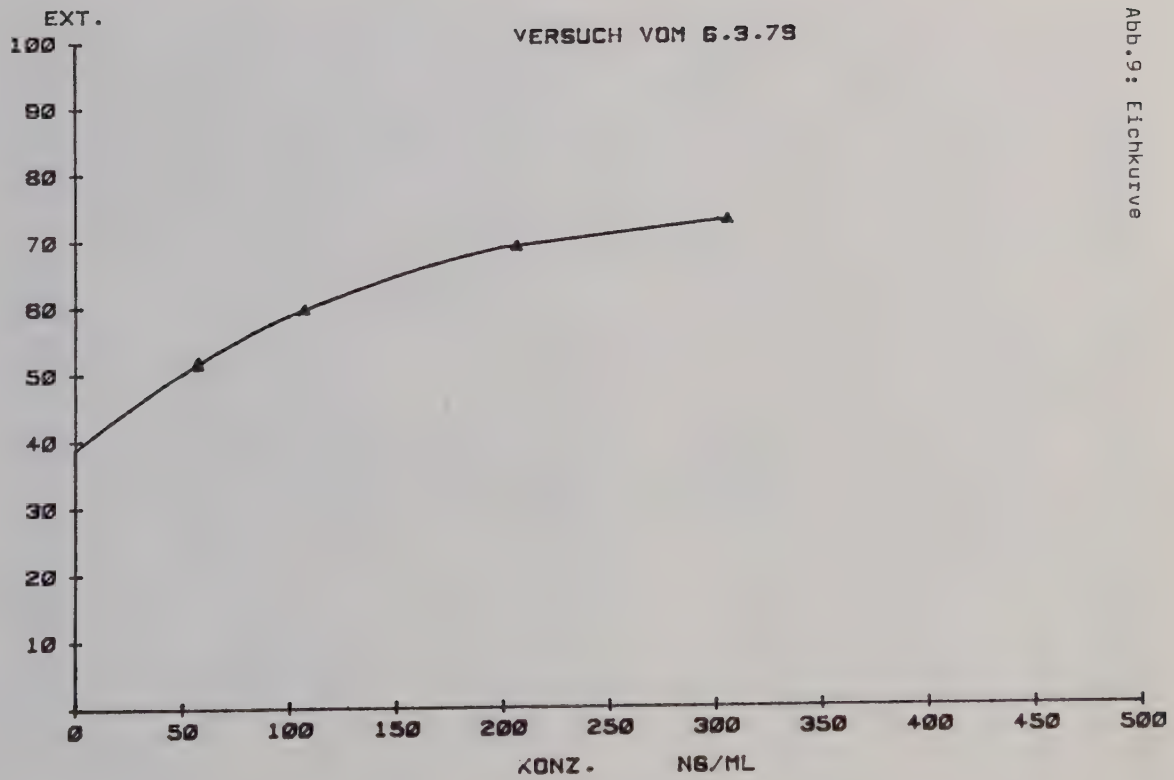


Abb.9: Eichkurve

dert. Es wurde von 125 µl Ak- und 100 µl Lysozymreagens (Herstellung siehe 5.3. Arbeitsvorschriften) über 125/75 auf 150/75 verändert. 150/50 stellte sich als Verschlechterung heraus, während beide anderen zu leichten Verbesserungen führten. Außerdem konnte durch diese Veränderungen die Leerextinktion noch weiter herabgedrückt werden. (vgl. auch Tab.5 und Abb.10,11)

Tabelle 4: Einfluß der Änderung der Reagentienmengen

	Nullwert	0→1 (ΔE)	1→m (ΔE)	Gesamtänderung (ΔE)
1. 125/100	41	19	24	43
2. 125/75	26	24	33	57
3. 150/75	18	23	38	61
4. 125/50	10	14	9	23
5. 150/100	30	23	34	57

oder bezüglich der Korrelation und des Variationskoeffizienten ausgedrückt:

1. 125/100	0,9864	17,3%
2. 125/75	0,9849	19,4%
3. 150/75	0,9899	12,8%

Eine weitere erhebliche Verbesserung der Steigung bei fast gleichbleibend niedrigen Ergebnissen für die Nullwerte wurde durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 25° auf 37° erreicht. Tabelle 6 und Abbildung 12 zeigen den Einfluß der Temperaturänderung auf die Eichkurve und den Variationskoeffizienten. Gleichzeitig le-

Tabelle 5: Vergleich von 125/75 und 150/75

ng Morphin/ml	wiedergefunden x	$\bar{x}$	V_k
50	55 43 49	49	12,5%
100	112 80 67	90	38,7%
200	293 202 278	258	19,2%
500	397 510 430	446	13,1%
50	45 36 60	47	25,8%
125	105 133 151	130	17,8%
250	294 307 302	301	3,0%
500	435 425	430	4,8%

Abb.10: Kurve 1 (125/100) Kurve 2 (125/75)

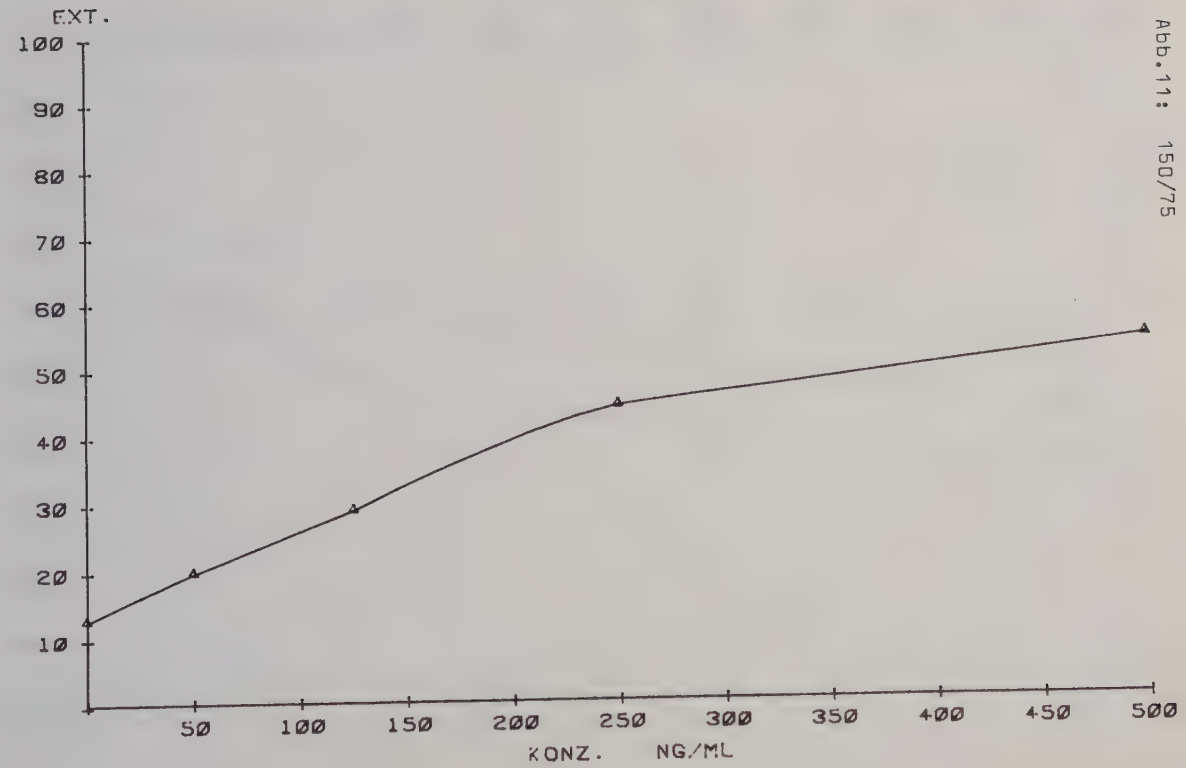

EXT.
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
KONZ. NG/ML

Abb.11: 150/75

Tabelle 6: Einfluß der Temperaturänderung und Variations-koeffizienten unter den neuen Bedingungen

	Nullwert	35ng/ml	125 ng/ml	500ng/ml
25° :	15	16	25	61 ΔE
37° :	16	19	50	100 ΔE

ng Morphin/ml	gefunden x	$\bar{x}$	V_k
35	8 39 43	30	
50	43 45 48 56	48	12,3%
87,5	83 96 83	87	9,0%
125	125 119 140	128	8,3%
250	240 278 231	250	10,0%
375	381 324 420	375	12,8%
500	468 505 531	502	7,5%

Abb.12: Eichkurve bei 37°

gen diese Ergebnisse aber nahe, daß - ein linearer Verlauf der Temperaturdifferenz/Extinktionsdifferenz-Beziehung vorausgesetzt - geringfügige Temperaturschwankungen des Gerätes beim Meßvorgang praktisch bedeutungslos sind.

5.2.2.4. Präzision von Tag zu Tag

Entgegen der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei ein und derselben Versuchsdurchführung, lieferte der Vergleich der Ergebnisse von Tag-zu-Tag jeweils wesentlich schlechtere Ergebnisse, wie aus Tabelle 7 ersichtlich ist. Diese Tatsache war umso bedauerlicher, als es dadurch nicht möglich war, eine für die Versuchsanordnung auf Dauer gültige Eichkurve aufzustellen.
Oellerich und Häckel (98) hatten bei ihren Untersuchun- für einen Urinassay schon dasselbe feststellen müssen, geben für diese Tatsache aber keine Gründe an. Deshalb erschien es geboten, einige mögliche Faktoren, die dafür verantwortlich sein könnten, zu untersuchen und eventuelle Fehlerquellen auszuschalten.

5.2.3. Untersuchung des Einflußes des Bakterienalters und des Antikörperalters auf die Extinktionsänderungen

Wie in den Kurven von Abbildung 13 und 14 sichtbar, haben beide Faktoren einen erheblichen Einfluß auf die Größe der Extinktionsänderungen. In Abb. 13 wurde die
Kurve 1 mit neu angesetzter Bakterien- und alter Ak-Lösung,
Kurve 2 mit neu angesetzter Bakterien- und Ak-Lösung,
Kurve 3 mit alter Bakterien- und neuer Ak-Lösung
erstellt.

Tabelle 7: Fehlerberechnung von Ergebnissen an verschiedenen Tagen durchgeführter Versuche

Konzentration	$x-x_o(1)$	$x-x_o(2)$	$x-x_o(3)$	V_k
0	34,4	36,5	38,8	
50	8	3,8	11,3	
	89 ng	50 ng	120 ng	40,6%
100	13,4	8,5	20	
	140 ng	100 ng	240 ng	45%
300	25	23	34	
	350 ng	300 ng	650 ng	43,7%
500	38,2	29,5	-	
	710 ng	500 ng		

Die Werte, die unter den Extinktionsänderungen $x-x_o$ stehen, sind die Konzentrationen, die sich errechnen, wenn man die Extinktionswerte in die Eichkurve 2 einsetzt. Der Variationskoeffizient wurde aus den umgerechneten Konzentrationen ermittelt.

Abb. 13: Einfluß des Bakterien- u. Antikörperalters

Abb. 14: Einfluß des Bakterienalters

In Abb. 14 wurden für Kurve 1 neue Bakterienlösung und für Kurve 2 alte Bakterien verwendet. Die Antikörperlösung war hier identisch.
Zu diesen beiden Faktoren kommen noch als nicht untersuchte Fehlerquelle mögliche Aktivitätsänderungen des Lysozyms. Da diese Schwankungen auszuschalten, einen unverhältnismäßig hohen Aufwand bei trotzdem zweifelhaftem Erfolg erfordern würde, erschien es sinnvoller, an jedem Analysentag eine neue Eichkurve aufzustellen. Weil dies aber auch einen erheblichen Mehraufwand bereiten würde, wurde versucht, dies mit einer rechnerunterstützten Auswertung wieder zu kompensieren.

5.2.4. Auswertungsverfahren

Die Auswahl eines passenden Computerverfahrens basiert im wesentlichen auf der vergleichenden Untersuchung von Vogt et al. (133). Anfängliche Versuche fanden mit einer logit/log transformierten Regressionsgeraden (siehe Tab.2) statt. Nach Prüfung auf Eignung für den vorliegenden Enzymimmunoassay im speziellen, fiel die Entscheidung zugunsten der polygonalen Interpolation. Dieses Verfahren ermöglichte neben der automatischen Umrechnung der Meßwerte in Konzentrationen auch das Ausdrucken der aufgestellten Eichkurve durch einen zusätzlich angeschlossenen Schreiber.

5.2.5.1. Festlegung des Eichbereiches und Bestimmung der kleinstmöglichen Zahl an nötigen Eichpunkten

Dem Urinassay der Firma Syva sind drei Kalibratoren beigefügt, nämlich ein Nullwert, ein low-Wert (0,5 mg/ml = 62,5 ng/ml Blutkonzentration) und ein medium-Wert (5 mg/ml = 625 ng/ml). Wie man aber aus verschiedenen

Versuchen ersehen kann, flacht die Kurve schon oberhalb 500 ng/ml so stark ab, daß Konzentrationsbestimmungen für Blutuntersuchungen in diesem Bereich nicht mehr sinnvoll erschienen. Wenn also eine Probe mit höherem Morphingehalt bestimmt werden soll, empfiehlt es sich, den Extrakt bei der Wiederaufnahme in Wasser entsprechend zu verdünnen. Das in den Arbeitsvorschriften beschriebene Extraktionsverfahren beinhaltet ja eine 8-fache Konzentrationserhöhung. Dadurch fällt auch natürlich die Nachweisgrenze unter den low-Wert, der für den Urinassay als Nachweisgrenze für sicher positive Werte angegeben wird. So wurden für die Eichkurve die Konzentrationen 50, 125, 250 und 500 ng/ml gewählt, weil außerdem, wie aus der vergleichenden Betrachtung der in Abbildung 15-17 gezeichneten Kurven hervorgeht, vier Eichpunkte zusätzlich zum Nullpunkt dafür wohl ausreichen, andererseits aber auch das Minimum einer sinnvollen Eichung darstellen dürften. Diese Feststellung wurde durch die Berechnungen in Tabelle 8 überprüft und erhärtet.

5.2.5.2. Richtigkeitskontrollen

In eine aus diesen 5 Eichpunkten gebildete Kurve wurden Extinktionswerte von zusätzlichen, bekannten Konzentrationen eingesetzt und die sich daraus ergebenden Konzentrationswerte errechnet. Dann wurden die errechneten Werte mit den tatsächlich verwendeten Mengen verglichen (siehe Tab.8).
In Abbildung 15-17 sind dann jeweils die Minimaleichkurve und die Eichkurve, in der die zusätzlichen Konzentrationen mit zur Eichung verwendet wurden, zusammen abgebildet.

Tabelle 8: Richtigkeitskontrollen

Konzentration(ng/ml)	gefunden ($\bar{x}$)	Abweichung
Versuch 1 (29.11.79)		
35	38,25	+ 9,2%
87,5	71,33	-18,5%
375	371,62	- 0,9%
Versuch 2 (1.2.80)		
75	90,73	+20,9%
175	156,62	-10,5%
375	311,52	-16,9%
Versuch 3 (12.2.80)		
75	86,93	+15,9%
175	187,47	+ 7,1%
375	347,82	- 7,2%

Abb.15: Richtigkeitskontrollen

Abb.16: Richtigkeitskontrollen

Abb.17: Richtigkeitskontrollen

5.2.6. Bestimmung der Nachweisgrenze

Hierzu wurde die Methode nach Kaiser (71) angewendet. Der Nullwert wurde 22 mal bestimmt, 7 verschiedene Extraktionen, mindestens je 3 mal analysiert. Anschließend wurde mit der Formel $\bar{x}_A = \bar{x}_{Be} + 3$ überprüft, ob ein Wert mit der geforderten Sicherheit positiv ist. Bei Anwendung der Formel für Mittelwerte ergibt sich für die gefundene Nachweisgrenze von 35 ng/ml ein zusätzlicher Sicherheitsspielraum (siehe Tab.9).
Diese Nachweisgrenze gilt für das normale Verfahren (siehe 5.3. Arbeitsvorschriften). Im Bedarfsfall können natürlich durch den Einsatz einer größeren Blutmenge und damit einer stärkeren Konzentrierung auch niedrigere Konzentrationen nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Berechnung der Nachweisgrenze

	1	2	3	4	5	6	7
Extinktionen	16	19,5	16,5	15,5	15,5	16	16
	14	17	16,5	16	15,5	16	12
	18	17	15	17	15	16	16
				14			
Mittelwerte	16	17,8	16	15,6	15,3	16	15,7

Mittelwert gesamt : $\bar{x} = 15,91$

Standardabweichung: $= 0,97$

Nachweisgrenze : $x_A = \bar{x}_{Be} + 3\sigma$; $\bar{x}_A = 15,91 + 2,91 = 18,82$

modifizierte Gleichung für Mittelwerte :

$\bar{x}_A = \bar{x}_{Be} + 3\sigma^x$ wobei $\sigma^x = \frac{1}{\sqrt{M}} \cdot \sigma_{Be}$

$\bar{x}_A = 15,91 + 3(\frac{1}{\sqrt{3}} \cdot 0,97) = 17,59$

Extinktionsmittelwert für Eichkonzentration 35 ng/ml : 19

Daraus ergibt sich, daß sich eine Morphinkonzentration von 35 ng/ml mit der geforderten Sicherheit nachweisen läßt.

5.2.7. Untersuchungen von Blutproben Drogentoter

Der Nachweis von Morphin im Blut von Personen, bei denen durch die Anamnese die Verdachtsdiagnose "Drogentod" vorher gestellt worden war, gelang mit einer Ausnahme durch die immunochemischen Untersuchungen immer. Auch die Konzentrationen liegen in dem Bereich, der in der Literatur für Überdosierungen angegeben wird.
In einem Fall war ein Drogensüchtiger bei einem Verkehrsunfall ums Leben gekommen. Die hierbei gefundene Morphinkonzentration lag mit 31 ng/ml deutlich unter den in den übrigen Fällen festgestellten Werten.
In Tabelle 10 sind die untersuchten Fälle mit den ermittelten Konzentrationen und Variationskoeffizienten aufgelistet. In den Fällen, in denen die Konzentration um oder über 500 ng/ml liegt, wurde der Extrakt stärker, d.h. auf 1 ml mit Aqua dest.verdünnt.

5.2.7.1. Einfluß des Alters von Proben auf die Nachweisbarkeit des Morphins

Bei zwei Todesfällen, bei denen genügend Blut zur Verfügung stand, wurde die Untersuchung im Abstand von etwa einem halben Jahr wiederholt (siehe Tab.10,Fortsetzung). Dabei ergab sich, daß die nachweisbare Morphinmenge in der Zwischenzeit erheblich gesunken war. Das Blut befand sich zum Zeitpunkt der zweiten Analyse bereits in äußerst zersetztem Zustand. Auch Reed (107) vermutete ja bereits, daß bei der Zersetzung des Blutes entstehende Substanzen den Nachweis von Drogen erheblich behindern können.

Tabelle10: Bestimmungen von Blutkonzentrationen Drogentoter

Nr. d. Probe	Konzentration	Verdünnung (ml)	V_k
1	388	0,5	
2	109	0,5	
3	140	0,5	
4	379	0,5	11,1%
5	993	1	1,1%
6	344		
7	265	0,5	85,6%
8	652	1	8,8%
9	466	0,5+1	7,9%
10	105	0,5	9,3%
11	366	0,5	25,5%
12	804	1	8,1%
13	55	0,5	24,1%
15	k.Nw.	0,5	
16	762	1	11,1%
19	612	1	0,0%
21	>1100	1	

Fortsetzung von Tabelle 10: Blutkonzentrationen Drogentoter

Nr.d.Probe	Konzentration (ng/ml)	Verdünnung(ml)	V_k
GS 429/78D.	940	1	5,6%
Gs 430/78Ö.	750	1	6,4%
GS 456/79L.	830	1	6,3%
GS St.	550	0,5+1	17,6%
		nur 1	0,0%
GS1067/78S.	1350	1	15,6%
GS K.	31	0,5	12,6%
GS 638/78B.(2)	57	0,5	31,5%
GS 35/78M.(2)	138	0,5	35,7%
GS 638/78B.(1)	410	0,5	
GS 35/78M.(1)	890	1,5+2+2,5	15,9%

(1) sind die Werte der ersten Bestimmung am 20.2.79

(2) sind die Werte der zweiten Bestimmung am 23.8.79

5.3. Arbeitsvorschriften

5.3.1. Extraktion

4 ml Blut wurden mit 16 ml Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer versetzt und damit etwa auf pH 9,5 gebracht. Im Bedarfsfall wurde das Gemisch mit einem Ultraturrax homogenisiert. Diese 20 ml der Probe wurden dann auf eine Extrelutsäule aufgebracht. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde ein schnelles Einziehen der Flüssigkeitsmenge und eine gleichmäßige Verteilung in der Kieselgurfüllung erreicht. Laut Hersteller ist es nämlich nötig, danach eine halbe Stunde zu warten, um ein vollständiges Aufziehen der wäßrigen Phase zu ermöglichen.
Anschließend wurde das Morphin mit 60 ml eines Gemisches aus Äther/Äthylacetat im Verhältnis 1:1 eluiert.

5.3.1.1. Eindampfmethode

Das Eluat wurde mit einigen Tropfen methanolischer Salzsäure angesäuert und dann eingedampft. Zur Analyse wurde es in 0,5 ml Aqua dest. aufgenommen und 25 µl dieser Lösung im Photometer untersucht.

5.3.1.2. Ausschütteln

Das Eluat wurde mit 500 µl einer 0,01 n Salzsäurelösung ausgeschüttelt und das Morphin rückextrahiert. Dann wurdirekt 25 µl dieser HCl-Lösung zur Analyse eingesetzt.

5.3.2. EMIT-Analyse

5.3.2.1. Herstellung der EMIT-Reagenzien

Je 1 ml der Antikörperlösung A wurde mit 4 ml EMIT-Dau Pufferlösung verdünnt, je 1 ml der Lysozym-Morphinlösung B mit 3 ml. Lysozym-Morphin Reagenz wurde unmittelbar vor Analysenbeginn, Antikörperreagenz 24 Stunden zuvor angesetzt. Beide Reagenzien wurden in Plastikgefäße abgefüllt, da sie nicht mit Glas in Berührung kommen sollen.
Bakterienlösung : ein Röhrchen Trockensubstanz wird in 100 ml EMIT-Dau Puffer aufgelöst und bei Kühlschranktemperatur mindestens 24 Stunden inkubiert. Dieses Konzentrat muß vor Versuchsbeginn im Verhältnis 1:2 mit Pufferlösung verdünnt werden.
Haltbarkeit der Reagenzien : Lösung A maximal 8 Tage, Lösung B 24 Stunden, Bakterienkonzentrat ca. 2 Wochen, alles immer bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

5.3.2.2. Analysendurchführung

Je 25 µl Probe wurden mit 300 µl Bakterienlösung vermischt und automatisch im Gerät auf die Meßtemperatur 25° oder 37° Celsius gebracht. Dann wurden, gleichzeitig, 150 µl A- und 75 µl B-Reagenz zugespritzt. Nach einer Spanne von 15 Sekunden ("delay") wurde dann die Extinktionsänderung 2 Minuten lang bei 441 nm im Meßbereich 0,05 E des Photometers gemessen und von einem Schreiber aufgezeichnet.
Die Probenvorbereitung erfolgte mit einem Dilutor LKB 2075 die Analyse mit einem Enzymanalysator LKB 2086. Die Extraktionen wurden als Dreifachbestimmung für jede Konzentration durchgeführt, von jeder Lösung erfolgte mindestens eine enzymkinetische Dreifachbestimmung (vgl. 121).

6. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein einfaches, in jedem Labor anwendbares Verfahren zur quantitativen Untersuchung von Morphin im Blut erstellt werden. Das beschriebene Verfahren eignet sich zur schnellen und empfindlichen Untersuchung auf das Vorliegen von Opiaten im Blut. Die erzielten Variationskoeffizienten entsprechen denen des RIA-Verfahrens. In früheren Untersuchungen waren für Urin weitaus höhere Variationskoeffizienten gefunden worden. Dies läßt sich mit der unterschiedlichen Zusammensetzung des biologischen Materials erklären, nicht nur dadurch, daß Lysozym als natürlicher Bestandteil im Urin vorkommt, sonder auch weil dieses Enzym durch hohe Salzkonzentrationen gehemmt wird. Durch die reproduzierbare Extraktion mit der Extrelut-Säule kommt zum Vorliegen einer gleichförmigen Matrix, die Störungen der Enzymreaktion vermeidet. Auf diese Weise wird eine quantitative Untersuchung überhaupt erst sinnvoll, da man nicht mehr mit dem Auftreten von Nebenreaktionen rechnen muß, die größere Extinktionsänderungen bewirken, als durch die verwendeten Konzentrationsunterschiede erreicht werden könnten.
Die Empfindlichkeit ist ausreichend, da bei therapeutischer Dosierung von z.B. 10 mg Morphinsulfat pro 70 kg Maximalkonzentrationen von 100 ng/ml gefunden werden (25). Die in dieser Arbeit gefundenen Werte bei Drogentoten stehen im Einklang mit denen der Literatur. In einem untersuchten Fall war ein Drogensüchtiger bei einem Verkehrsunfall tödlich verunglückt. Die hierbei aufgefundene Morphinkonzentration lag mit 31 ng/ml deutlich unter den Werten für Drogenzwischenfälle.
Das beschriebene Verfahren bestimmt das im Blut vorliegende freie Morphin; durch eine vorhergehende Hydrolyse

ist auch der gesamte Morphin-Gehalt des Blutes bestimmbar. Wenn die Zeit bekannt ist, die seit der Applikation vergangen ist, ist es allerdings - zumindest bei therapeutischer Konzentration - möglich, den Gesamt-Morphingehalt mittels der aufgeführten Kinetikmeßkurve in etwa zu errechnen. Die Methode eignet sich nicht nur für den hier beschriebenen, automatischen Betrieb, sondern ist im Prinzip mit jedem Photometer verwendbar. Damit ist eine schnelle Morphinbestimmung mit den in jedem chemisch-toxikologischen Labor vorhandenen Geräten möglich.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über analytische Verfahren zum Nachweis von Opiaten berichtet, mit Schwerpunkt auf dem quantitativen Aspekt der Untersuchungen. Zusammenfassend wird EMIT noch mit seinem Hauptkonkurrenzverfahren, dem RIA verglichen.
Da EMIT nicht direkt zur Analyse von Blut eingesetzt werden kann, werden als einfache und effektive Möglichkeit die Extraktionen mit Extrelut-Säulen durchgeführt. Es wurde auch deren Effektivität überprüft.
Durch Variation der verschiedenen Versuchsbedingungen (Temperatur, Meßzeit, Antikörper/Lysozym-Gemisch) wurde die bestmögliche Form der Eichkurve bestimmt (niedrige Leerwerte, möglichst große Steigung). Nach Auswahl eines passenden Computerverfahrens werden die Eichkurven mit Rechnerunterstützung erstellt, und die kleinstmögliche Zahl von Eichpunkten wird ermittelt. Der bestmögliche Meßbereich wird festgelegt und die Nachweisgrenze bestimmt.
Verschiedene mögliche Fehlerquellen werden untersucht und gegebenenfalls eliminiert. Die Gründe für die schlechte Präzision werden bestimmt und als verfahrensimmanent erkannt.
25 Blutproben von nach Drogenzwischenfällen Verstorbener werden nach dem aufgestellten Verfahren untersucht und die enthaltene Drogenmenge bestimmt. Es werden die Ergebnisse der Eichkurven und der Analysen statistisch untersucht und Fehlerberechnungen erstellt.

8. Literaturverzeichnis

1. Adler,F.L., Liu,C.T. : Detection of morphine by hemagglutination inhibition, J. Immunol. 106, 1971, 1684 ff.
2. Adler,F.L., Liu,C.T., Catlin,D.H. : Immunological studies on heroin addiction. I. Methodology and application of a hemagglutination-inhibition test for detection of morphine, Clin. Immunol. Immunopathol. 1, 1972, 53-68
3. Adler,T.K., Fujimoto,J.M., Way,E.L., Baker,E. : J. Pharmacol. Exp. Ther. 114, 1955, 251-262
4. Advenier,C., Fabiani,P., Quattrocchi-Sosson, Détection de la diamorphine (héroine) et ses metabolites dans les urines des toxicomanes, C.R. Acad. Sci. Paris t 275, 1972, 877
5. Baselt,R.C. : Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, Vol.1 Centrally-acting drugs, 3-28
6. Baselt,R.C., Allison,D.J., Wright,J.A., Scannel,J.R., Stephens,B.G. : Acute Heroin Fatalities in San Francisco, Western Journal of Medicine, Vol. 122, 1975, 455-458
7. Bayse,D., Lewis,D.S. : Drug Abuse, Survey II : Amphetamine-Barbiturate-Methadone-Morphine, Dep. of Health, Education and Welfare, Atlanta 1972
8. Belles,Q.C., Sievert,H.W. : J. Lab. & Clin. Med., 1955, 628
9. Berkowitz,B.A., Cerreta,K., Spector,S. : Influence of physiologic and pharmacologic factors on the disposition of morphine as determined by radioimmunoassay, J. Pharmacol. Exp. Ther. 191, 1975, 557-566
10. Berkowitz,B.A., Ngai,S.H., Yang,J.C., Hempstead,J., The disposition of morphine in surgical patients,

Pharmacology and Therapeutics, St. Louis, Vol.17, No. 6, 1975, 629-635

11. Blake,J.W., Hoffman,R., Norman,J., Ray,R. : American Laboratory, 1973, 63
12. Boerner,U., Abbott,S. : Experientia 29, 1973, 180-181
13. Boerner,U., Abbott,S., Roe,R.L. : The metabolism of morphine and heroine in man, Drug Metab. Res. 4, 1975, 39-73
14. Boerner et al. : The formation of norcodeine from morphine in man (Letters to the editor), J. Pharm. Pharmac. 27, 1975, 215
15. Boerner,U., Roe,R.L., Becker,C.E. : Detection, isolation and caracterization of normorphine and norcodeine as morphine metabolites in man, J. Pharm. Pharmac. 26, 1974, 393-398
16. Bösche,J., Gelbke,H.P. : Radioimmunologische Morphinbestimmung in der Glaskörperflüssigkeit des Auges und im Liquor cerebrospinalis, Arch. f. Krim. 150, 34
17. Boerner,U., Roe,R., Becker,C.E. : The formation of norcodeine from morphine in man, J. Pharm. Pharmac. 27, 1975, 215-216
18. Bohn,G., Schulte,E., Audick,W. : Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen an im Münsterland in den Jahren 1972-1976 sichergestellten Heroinproben, Arch. f. Krim. 160, 27-33
19. Bösche,J. : Morphin aus Urin. Dünnschichtchromatographischer Screening Test, Archiv gerichtliche Medizin, Universität Heidelberg, 1973
20. Bradford,L., Brackett,J.W. : Report of systematic ultraviolett spectrophotometric data of dangerous drugs, poisons and narcotics, Criminalistics, San Jose, California

21. Brochmann-Hanssen,E., Svendsen,A.B. : J. Pharm. Sci. 51, 1962, 1095
22. Brochmann-Hanssen,E., Svendsen,A.B. : Quantitative Determination of Morphine in Opium by Gas-Liquid Chromatography, J. Pharm. Sci. 52, 1963, 1134-1136
23. Broughton,A., Ross,D.L. : Drug Screening by Enzymatic Immunoassay with the Centrifugal Analyzer, Clin. Chem. 21/2, 1975, 186-189
24. Brugaard,G., Rasmussen,K.E. : Quantitative gas-liquid chromatography of amphetamine, ephedrine, codeine and morphine after on-column acylation, J. of Chromatography 147, 1978, 476-480
25. Brunk,S.F., Delle,M. : Morphine metabolism in man, Pharmacology and Therapeutics, 1974, 51-57
26. Catlin,D.H. : Urine testing : A comparison of five current methods for detecting morphine, Am. Journal Clin. Path. 60, 1973, 719
27. Catlin,D.H., Cleeland,R., Grunberg,E. : A sensitive, rapid radioimmunoassay for morphine and immunological related substances in urine and serum, Clin. Chem. 19, 1973, 216
28. Chao,J.M., Saferstein,R., Manura,J. : Identification of Heroin and Its Diluents by Chemical Ionisation Mass Spectroscopy, Analytical Chemistry Vol. 46, 1974, 296
29. Christopoulos,G.N., Kirch,E.R. : Isolation and Identification of Morphine from Post Mortem Tissues, J. Chromatography 65, 1972, 507-519
30. Clark,C.C. : A Study of Procedures for the Identification of Heroin, J. of Forens. Sci., 1976, 418-428
31. Clarke,E.G.C. : Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, London, 1969, 143 u. 513

32. Cleeland,R., Christenson,J., Usategui-Gomez,M., Heveran,J., Davis,R., Grünberg,E. : Detection of Drugs of Abuse by Radioimmunoassay : A Summary of Published Data and Some New Information, Clin. Chem. 22, 1976, 712-725
33. Coumbis,R., Kaul,B. : Distribution of Morphine and Related Compounds in Human Tissues and Biological Fluids Using Radioimmunoassay Techniques, J. Forens. Sci. 19, 1974, 307-312
34. Dahlström,B., Bolme,P., Feychting,H., Noack,G., Paalzow,L. : Morphine kinetics in children, Clin. Pharmacol. Ther., Vol.26, No.3, 1979, 354-365
35. Dahlström,B., Paalzow,L. : Quantitative determination of morphine in biological samples by gas-liquid chromatography and electron-capture detection, J. Pharm. Pharmac. 27, 1975, 1972-1976
36. Dahlström,B., Paalzow,L., Edlund,P.O. : Simultaneous Determination of Codeine and Morphine in Biological Samples by Gas Chromatography with Electron Capture Detection, Acta pharmacol. et toxicol. 41, 1977, 273-279
37. Darwin,W.D., Cone,E.J. : Fluorescence Properties of Pseudomorphine and Congeners : Structure-Activity Relationship, J. of Pharmaceutical Sci., Vol.69, No.3, 1980, 253-257
38. Dawidow,B., Petri,N.L., Quame,B. : A thin-layer chromatographic screening procedure for detecting drug abuse, Am. J. Pathol. 50, 1968, 714-719
39. Diagnostica Merck, Merckotest Emit-dau, Enzymimmunoassay zum Nachweis bzw. zur semiquantitativen Bestimmung von Drogen und Arzneimitteln im Urin, Informationsschrift d. Fa. Merck
40. Ebbighausen,W.O.R., Movat,J.W., Vestergaard,P., Kline,N.S. : Advan. Biochem. Psychopharmacol. 7, 135

41. Ebbighausen,W.O.R., Movat,J.W., Vestergaard,P. : Mass Fragmentographic Detection of Normorphine in urine of Man after Codeine Intake, J. Pharm. Sci. 62, 1973, 146
42. Elison,H.W., Elliot,C. : Studies on the Enzymatic N- and O-Demthylation of Narcotic Analgesics and Evidence for the Formation of Codeine from Morphine in Rats and Dogs, J. Pharmac. Exp. Ther. 144, 265
43. Elliot,H.W., Parker,K.D., Wright,J.A. et al. : Actions and metabolism of heroin administered by continuous intravenous infusion to man, Clin. Pharm. Ther.12, 1971, 806-814
44. Eskes,D., Brown,J.K. : Heroin-caffeine-strychnine mixtures; where and why?, Bulletin on Narcotics, Vol. XXVII, No.1, 1975, 67-69
45. Felby,S. : Morphine: Its Quantitative Determination in Nanogramm Amounts in Small Samples of Whole Blood by Electron-Capture Gas Chromatography, Forensic Science International 13, 1979, 145-150
46. Felby,S., Christensen,H., Lund,A. : Morphine concentrations in blood and organs in cases of fatal poisoning, Forensic Sci. 3, 1974, 77-81
47. Finkle,B., Taylor,D.M. : J. Chrom. Sci. 10, 1972, 312
48. Fischer,R., Chalupa,L. : Zum Nachweis narkotisch wirkender Substanzen in biologischem Material, Archiv f. Kriminologie 1949, 259-266
49. Fraser,H.F., Gorodetzky,C.W., Yeh,S.Y., Kay,D.C. : The possible importance of nor-metabolites in the pharmacology of some opiods, The Pharmacologist 17, 1975, 175
50. Fraser,H.F., Istell,H., van Horn,G.D. : Human pharmacology, addiction hability of norcodeine, J. Pharmacol. Exp. Ther. 129, 1960, 172-177

51. Fraud,U.I., Shim,C.S., Williams,M.H.Jr : Heroin-induced pulmonary edema : sequential studies of pulmonary function, Ann. Intern Med. 77, 1972, 29-35
52. Garnott,J.C., Sturner,W.Q. : Morphine concentrations and survival periods in acute heroin fatalities, New Eng. J. Med. 2389, 1973, 1276-1278
53. Garrett,E.R., Gürkan,T. : Pharmakokinetics of Morphine and Its Surrogates II : Methods of Separation of Stabilized Heroin and Its Metabolites from Hydrolyzing Biological Fluids and Applications to Protein Binding and Red Blood Cell Partition Studies, J. of Pharmac. Sci., Vol.68, No.1, 1979, 26-32
54. Gelbke,H.P., Bösche,J. : Radioimmunologischer Nachweis von Morphin im Hämatomblut bei einem um eineinhalb Tage überlebten Unfall, Archiv f. Kriminologie, 160. Bd., 31-35
55. Gelbke,H.P., Schlicht,H.J., Schmidt,G. : Radioimmunological Screening and Gas Chromatographic Identification of Diazepam in Blood and Serum, Arch. Toxicol. 38, 1977, 295-305
56. Goldbaum,L.R., Santinga,P.H., Dominguez,A.M. : A procedure for rapid analysis of large numbers of urine samples for drugs, Clin. Toxicol. 5, 1972, 367
57. Gorodetzky,Ch.W. : Time course of morphine detection in human urine after i.v. heroine, Fed. Proc. 31, 1972, 528
58. Gorodetzky,Ch.W., Kullberg,M.P. : Validity of screening methods for drugs of abuse in biological fluids, Clin. Pharm. Ther., Vol.15, No.6, 1974, 579-587
59. Hellman,E.Z., Spiehler,V., Holland,S. : Elimination of Error Caused by Hemolysis and Bilirubin-Induced

Color Quenching in Clinical Radioimmunoassay, Clin. Chem., Vol.20, No.9, 1974, 1187-1193

60. Helpern,M. : Fatalities from narcotic addiction in New York City. Incidence, circumstances and pathologic findings, Human Pathol., A Clinico-Pathologic Quart., 3, 1972, 13
61. Hipps,P.P., Eveland,R.M., Meyer,E.R., Sherman,W.R., Cicero T.J. : Mass fragmentography of morphine : relationship between brain levels and analgesic activity, J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 1976, 643
62. Ho,I.K., Loh,H.H., Way,E.L. : J. of Chromatography 65, 1972, 577
63. Huber,D.H., Stivers,R.R., Howard,L.B. : Heroin Overdose Deaths in Atlanta, J. of the Am. Medical Association, Vol.228, No.3, 1974, 319-322
64. Hug,C.C. : Plasma Levels of Morphine in Anesthetized Patients, Pharmacologist 17, 1975, 175
65. Hug,C.C., Mellett,L.B., Cafrung,E.J. : Stop-flow analysis of the renal excretion of tritium-labeled dihydromorphine, J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 1965, 259-269
66. Jain,N.C., Kirk,P.L.: Systematic Applications of Gas-Liquid Chromatography in Toxicology: I. Extraction Procedure and the Alkaloids, Microchem. J. 12, 1967, 229-241
67. Jain,N.C., Sneath,T.C., Budd,R.D. et al. : Gas chromatographic/thin-layer chromatographic analysis of acetylated codeine and morphine in urine, Clin. Chem. 21, 1975,1486-1489
68. Jatzkewitz,H. : Ein klinisches Verfahren zur Bestimmung von basischen Suchtmitteln im Harn, Zeitschrift f. Physiolog. Chemie, Bd.292, 1953, 94-100
69. Johannesson,T., Becker,B.A. : Morphine Analgesia in rats of various ages, Acta Pharmacol. Toxicol 33,

1973, 429-441

70. Johnson,E.H., Goldbaum,L.R., Whelton,R.L. : Investigation of sudden deaths in addicts, Med. Ann. D.C. 38, 1969, 375-380
71. Kaiser,H. : Zum Problem der Nachweisgrenze, Zeitschrift f. analyt. Chemie 209, 1965, 1-17
72. Kim,H.J., Cerceo,E. : Interference by NaCl with the EMIT method of analysis for drugs of abuse, Clin. Chem. 21, 1976, 1935-1936
73. Klug,E. : Chemische Befunde bei einigen seltenen Vergiftungen, Z.f. Rechtsmedizin 71, 1972, 27-36
74. Klug,E., Toffel,P. : Kombinierte enzymimmunologische-dünnschichtchromatographische Morphinbestimmung, Fresenius Zeitung f. Analyt. Chemie 294, 1979, 46-47
75. Kogan,M.J., Chedeckel,M.A. : Rapid G.l.c. method for the separation of picogram quantities of morphine and codeine, J. Pharm. Pharmacol. 28, 1976,261
76. Kupferberg,H., Burkhalta,A., Way,E.L. : A sensitive fluorometric assay for morphine in plasma and brain, J. Pharmacol. Exp. Ther. 145, 1964, 247
77. Kuschinsky,G., Lüllmann,H. : Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 7. Auflage, 1976
78. Leute,R.K., Ullman,E.F., Goldstein,A. : Spin immunoassay in urine and saliva, J.A.M.A. 221, 1972, 1231-1234
79. Leute,R.K., Ullman,E.F., Goldstein,A., Herzenberg,A. Spin immunoassay technique for determination of morphine, Nature 236, 1972, 93-94
80. Levine,L.H., Hirsch,C.S., White,L.W. : Quinine cardiotoxicity: a mechanism for sudden death in narcotic addicts, J. Forens. Sci. 18, 1973, 167-172
81. Loh,H.H., Ho,I.K., Cho,T.M., Lipscomb,W. : Estimation of morphine by polyamide mini thin-layer

chromatography, J. of Chromatography 76, 1973, 505
82. McIntyre,J.A., Armandi,A.E. : Improved Detection of Morphine on TLC Plates, Clin. Chem., Vol.22, No.3, 1976, 396
83. Mellett,L.B., Woods,L.A. : The distribution and fate of morphine in the non-tolerant and tolerant monkey, J. Pharmacol. Exp. Ther. 116, 1956, 77-83
84. Metter,D., Magerl,H. : Akute tödliche Vergiftung durch Schnupfen von Heroin, Archiv f. Kriminologie, 163. Bd., 95-96
85. Milne,G.W.A., Fales,H.M., Axenrod,T. : Anal. Chem. 43, 1971, 1815
86. Milne,G.W.A., Scribner,B.H., Crawford,M.A. : Non-ionic diffusion and the excretion of week acids and bases, Am. J. Med. 24, 1958, 709-729
87. Moore,J., Bena,F.E. : Rapid Gas Chromatographic Assay for Heroin in Illicit Preparations, Analyt. Chemistry 44, 1972, 385
88. Moore,J. : Rapid and Sensitive Gas Chromatographic Quantitation of Morphine, Codeine and O-Acetylmorphine in Illicit Heroin Using an Electron Capture Detector, J. of Chromatography 147, 1978, 327-336
89. Moosmayer,A., Besserer,K. : Renale Codein- und Morphin-Ausscheidung nach Codeineinnahme, Beiträge zur gerichtl. Medizin, 1981, 110-112
90. Mulé,S.J. : Methods for the Analysis of Morphine and Related Surrogates: Current Status J. of Chromat. Sci., Vol.12, 1974, 245-253
91. Mulé,S.J., Hushin,P.L. : Analyt. Chem. 43, 1971, 708
92. Nakamura,G.R. : J. Assoc. Off. Analyt. Chem. 49, 1966, 1086
93. Nakamura,G.R. : Toxicologic Assessment in Acute Heroin Fatalities, Clin. Toxicology 13, 1978, 75-87

94. Nakamura,G.R., Noguchi,T.T., Jackson,D., Banks,D. : Forensic Identification of Heroin in Illicit Preparations, Analyt. Chem. 44, 1972, 408
95. Nakamura,G.R., Ukita,T. : J. Forens. Sci. 1, 1962, 465
96. Nakamura,G.R., Way,E.L. : Determination of Morphine and Codeine in Post-Mortem specimen, Anal. Chemistry 47, 1975, 775
97. Oddendorf,W.H., Hyman,S., Braun,L. et al. : Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin and methadone after carotid injection, Science 178, 1972, 984-986
98. Oellerich,M., Haeckel,R. : Einsatz von Enzymimmunotests beim Drogen-Screening, Lab. med. 3, 1979, 65-70
99. Oellerich,M., Külpmann,W.R., Haeckel,R. : Drug Screening by Enzyme Immunoassay (EMIT) and Thin-Layer Chromatography (Drug Screen), J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol.15, No.5, 1977
100. Oestreicher,P.M., Farmilo,C.G., Levi,L. : Bull. on Narcotics 6, 1954, 42
101. Oguri,K., Ida,S., Yoshimura,H., Taukamoto,H. : Chem. Pharm. Bull. 18, 1970, 2414-2419
102. Parker,K.D., Wright,J.A., Halpern,A.F., Hine,C.H. : Preliminary report on the detection and quantitation of opiates and certain other drugs of abuse as trimethylsilyl- derivatives by gas liquid chromatography, J. Forensic Sci. Soc. 10, 1970, 17
103. Pickett,R.D., Acute toxicity of heroin alone and in combination with cocaine or quinine, Brit. J. Pharmacol. 40, 1970, 145
104. Püschel,K., Schulz,F., Naeve,W., Arnold,W. : Todesfälle nach nasaler Applikation von Heroin, Zeitschrift f. Rechtsmedizin 84, 1980, 279-290

105. Rasmussen,K.E. : Quantitative morphine assay by means of gas-liquid chromatography and on-column silylation, J. Chromatogr. 120, 1976, 491-495
106. Rasmussen,K.E., Tönnesen,F., Nielsen,B., Lunde,B., Röe,J. : Liquid Chromatographic Determination of Morphine in Aqueous and Organic Poppy Extracts, Medd. Norsk Farm. Selsk., 1978, 117-125
107. Reed,D. : Comparison of Spectrofluorometric and GC/MS Procedures for the Quantitation of Morphine in Blood and Brain, Clinical Toxicology 14 (2), 1979, 169-180
108. Reed,D., Spiehler,V.R., Cravey,R.H. : Two Cases of Heroin-Related Suicide, Forensic Science 9, 1977, 49-52
109. Reuland,D.J., Trinler,W.A. : Unequivocal Determination of Heroin in Simulated Street Drugs by a combination of high-performance liquid chromatography and infrared spectrophotometrie using micro-sampling techniques, J. Forens, Sci. 23(1), 1978, 37-43
110. Reynolds,P.C. : Morphine free in blood, urine and tissue, morphine total in bile, Traces 10, 1972, 1
111. Richards et al. : Death from Intravenously Administered Narcotics: A Study of 114 Cases, J. Forens. Sci. 21, 1976, 467-482
112. Robinson,A.E., Williams,F.M. : Post-Mortem Distribution of Morphine in Heroin Addicts, Med. Sci. Law 11, 1971, 135-138
113. Rubenstein,K.E., Schneider,R.S., Ullman,E.F. : "Homogenous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique, Biochem. Biophys. Res. Commun 47, 1972, 846-851
114. Saferstein,R., Chao,J. : J. Ass. Offic. Anal. Chem. 56, 1973, 1234
115. Saferstein,R., Manura,J., Brettell,T.A. : Chemical Ionization Mass Spectroscopy of Morphine Derivatives

J. Forens. Sci. 1976, 312-316

116. Sansur,M., Buccofuri,A., Morgenstern : J. of AOAC 55, 1972, 880

117. Santinga,P.H. : Application of Fluorescence and Gas Chromatography to Mass Drug Screening, Fluorescence News, Vol.6, No.3, 1971, 1-7

118. Schneider,R.S., Lindquist,A., Wong,E.T., Rubenstein, K.E., Ullman,E.F. : Homogenous enzyme immunoassay for opiates in urine, Clin. Chem. 19, 1973, 821-825

119. Schrott,L. : Enzymimmunoassay, Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28 (II), Heft 11a, 1978, 1934-1935

120. Serfontein,W.J., Botha,D., De Villiers,L. : A rapid g.l.c. procedure for the determination of codeine and norcodeine in biological fluids based on microphase extraction techniques, J. Pharm. Pharmac. 27, 1975, 937-939

121. Slightom,E.L. : The analysis of Drugs in Blood, Bile and Tissue with an Indirect Homogenous Enzyme Immunoassay, J. Forens. Sci. 1977, 292-303

122. Smith,D.A., Cole,W.J. : Rapid and sensitive gas chromatographic determination of Diacetylmorphine and metabolite Monoacetylmorphine in blood using a nitrogen detector, J. of Chromatography 105, 1975, 377-381

123. Sohn,D., Simon,J. : Rapid Identification of Psychopharmacologic Agents in Cases of Drug Abuse, Clin. Chem. 18, 1972, 405

124. Spector,S. : Quantitative Determination of Morphine in Serum by RIA, J. Pharmacol. Exp. Ther., Vol.178, 1971, 253-258

125. Spector,S., Parker,C.W. : Morphine radioimmunoassay, Science 168, 1970, 1347-1348

126. Spector,S., Vesell,E.S. : Disposition of Morphine in Man, Science 174, 1971, 421-422

127. Spiehler,V.R., Reed,D., Cravey,R.H., Wilcox,W.P., Shaw,R.F., Holland,S. : Comparison of results for quantitative determination of morphine by RIA and spectrofluorometry, J. Forens. Sci. 20, 1975, 647-655
128. Stansky,D.R., Greenblatt,D.J., Lappas,D.G., Koch-Seser,J., Lowenstein,E. : Kinetics of high-dose intravenous morphine in cardiac surgery patients, Clin. Pharmacol. Ther. 19, 1976, 752-756
129. Street,H.V. : Gaschromatographie von Submikrogramm-mengen von Drogen. III. Alkaloide in biologischem Material, J. Chromatogr. 29, 1967, 68-79
130. The Technicon Automated Morphine System (technical bulletin), Technicon Instruments Corp. Tarrytown, New York, 1-4
131. Viala,A., Estadien,M. : J. Chromatography 72, 1972, 127
132. Vidic,E. : Methode zur spektrophotometrischen Unterscheidung und Bestimmung von Morphin-Derivaten, Inst. f. gerichtl. Med. d. FU Berlin, 11. Jahrgg., Heft 4, 1959, 408-412
133. Vogt,W. et al. : Enzymimmunoassay - Grundlagen und praktische Anwendung, Sonderdruck d. Georg Thieme Verlages, Stuttgart 1978
134. Wallace,J.E., Biggs,J.D., Blum,K. : Gas-Liquid and Thin-Layer Chromatographic Determination of Morphine in Biological Specimens, Clinica Chimica Acta (Amsterdam) 1971, 4758
135. Wallace,J.E., Hamilton,H.E., Blum,K., Petty,C. : Determination of Morphine in Biological Fluids by Electron Gas-Liquid Chromatography, Analyt. Chem., Vol.46.,1974, 2107
136. Way,E.L., Adler,T.K. : The Biological Disposition of Morphine and its Surrogates, Bull. WHO 25, 1961,

227-262 u. 26, 1962, 51-66

137. Way,E.L., Adler,T.K. : The Pharmacologic Implications of the Fate of Morphine and Its Surrogates, Pharmacol. Rev. 12, 1960, 383-446

138. Way,E.L., Young,J.M., Kemp,J.W. : Bulletin des stupéfiants, XVII (1), 1965, 25

139. Weksler,M.E., Cherubin,C., Kilcoyne,M., Koppel,G., Yoel,M. : Absence of Morphine-Binding Activity in Serum from Heroin Addicts, Clin. Exp. Immunol. 13, 1973, 613-617

140. Woods,L.A. : Distribution and Fate of Morphine in Non-Tolerant and Tolerant Dogs and Rats, J. Pharmacol. Exp. Ther. 112, 158-175

141. Yeh,S.Y. : Absence of evidence of biotransformation of morphine to codeine in man, Experientia 30, 1974, 265-266

142. Yeh,S.Y. : Isolation and identification of morphine of morphine ethereal sulfate, normorphine conjugate as morphine metabolites in man, Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol. 32, 1973, 763

143. Yeh,S.Y. : Question about the formation of norcodeine from morphine in man (Letters to the Editor), J. Pharm. Pharmac. 27, 1975, 214-215

144. Yeh,S.Y. : Urinary excretion of morphine and its metabolites in morphine-dependent subjects, J. Pharm. Exp. Ther. 192, 1975, 201-210

145. Yeh,S.Y., Woods,L.A. : Determination of radioactive labeled codeine, morphine, dihydromorphine and their metabolites in biological materials, J. Pharm. Sci. 59, 1970, 380-384

146. Yong,Lim Han, Ng Tju Lik : L'excrétion urinaire de morphine et de codéine chez l'homme après consommation de morphine, d'opium, de codéine et d'héroine, Bulletin des stupéfiants, Vol. XXIX, No.3

147. Yoshimura,H., Mori,M.A., Oguri,K., Tsukamoto,H. :
Biochem. Pharmac. 19, 1970, 2353-2360

Herrn Prof. Dr. med Spann danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Dr. L. von Meyer für die freundliche Betreuung und den übrigen Mitarbeitern des Hauses für ihre hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Name:	Christian Stumpf
Geburtsdatum:	23.3.1957
Geburtsort:	München
Vater:	Finanzpräsident a.D. Georg Stumpf
Mutter:	Gertie Stumpf, geb. Fritsch
Schulbildung:	
1963	Volksschule an der Camerloherstraße in München
1964 bis 1967	Volksschule St.Peter u. Paul in Landshut
1967 bis 1976	Hans Leinberger-Gymnasium in Landshut
Juni 1976	Abitur
Studium:	
1976 bis 1983	Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München
Mai 1983	Staatsexamen und Approbation als Arzt
seit	
Juli 1983	Ableistung des Wehrdienstes bei der Bundeswehr